

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DAS RECEPTORAS DE EMBRIÕES
BOVINOS (*Bos taurus* ou *Bos indicus*) SOBRE A TAXA DE
GESTAÇÃO

CAROLINA SANT'ANA DA SILVA REBELO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

DOUTOR LUÍS LOPES DA COSTA

DOUTORA GRAÇA FERREIRA DIAS

ORIENTADOR:

DOUTOR ANTÓNIO RIBEIRO FILHO

CO-ORIENTADOR:

DOUTORA MARINA FRAÚSTO DA SILVA

2008
LISBOA

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DAS RECEPTORAS DE EMBRIÕES
BOVINOS (*Bos taurus* ou *Bos indicus*) SOBRE A TAXA DE
GESTAÇÃO

CAROLINA SANT'ANA DA SILVA REBELO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

DOUTOR LUÍS LOPES DA COSTA

DOUTORA GRAÇA FERREIRA DIAS

ORIENTADOR:

DOUTOR ANTÓNIO RIBEIRO FILHO

CO-ORIENTADOR:

DOUTORA MARINA FRAÚSTO DA SILVA

2008
LISBOA

RESUMO

Influência do Genótipo das Receptoras de Embriões Bovinos (*Bos taurus* ou *Bos indicus*) sobre a Taxa de Gestação.

O presente estudo teve como objectivo avaliar a influência do genótipo da receptora de embriões bovinos sobre a taxa de gestação. Foram utilizadas fêmeas bovinas da raça Nelore registadas na ABCZ (Associação Brasileira de Criadores de Zebu) de superioridade genética comprovada como dadoras de embriões. Para receptoras, seleccionaram-se 571 fêmeas bovinas em idade reprodutiva, cruzadas de genótipos *Bos taurus* e cruzadas de genótipos *Bos indicus* com condição corporal entre 3 e 4 (escala de 1 a 5). Todas as fêmeas utilizadas foram avaliadas quanto ao seu estado clínico-ginecológico, para verificar se estavam aptas ao processo de superovulação (dadoras) e à manutenção de uma possível gestação (receptoras). As receptoras foram divididas em dois grupos, tendo como principal critério a divisão dos genótipos entre as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus*. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos, pelo que a variável genótipo da receptora não influenciou a taxa de gestação. Porém, a taxa de gestação foi influenciada por outros factores como o estágio de desenvolvimento do embrião e a dificuldade de passagem pelo cervix. Assim, animais cruzados de *Bos taurus* podem ser utilizados em programas de Transferência de Embriões, no Brasil, com resultados equivalentes às receptoras de embriões *Bos indicus*, quando o manejo é adequado.

Palavras-chave: *Bos taurus*, *Bos indicus*, taxa de gestação, transferência de embriões.

ABSTRACT

The influence of the bovine embryo recipient genotype (*Bos taurus* or *Bos indicus*) on the pregnancy rate.

The present study was carried out with the objective of evaluating the influence of the bovine embryo recipient genotype on the pregnancy rate. As donors were used cows of Nelore breed with proven genetic superiority, recorded in the ABCZ (Brazilian Association of Zebu Breeders). For recipients were selected females at reproductive age, with a body score condition (BSC) between 3 and 4 (1 to 5 scale) crossbreed of the *Bos taurus* genotypes and crossbreed of the *Bos indicus* genotypes. All females used were assessed for their clinical and gynecological state, to verify if they were able to be superovulated (donors) and to maintain a possible pregnancy (recipients). The recipients were divided in 2 groups, using as main criterion the division between *Bos taurus* and *Bos indicus* genotypes. There was no statistics difference ($p>0,05$) between the groups. The recipient genotype did not influence the pregnancy rate, although it has been influenced by the embryo development stadium and the difficulty of passing the cervix. So *Bos taurus* crossbreed animals can be used in Embryo Transfer programmes, in Brazil, with equivalent results to *Bos indicus* recipients, when the management is appropriated.

Key words: *Bos taurus*, *Bos indicus*, pregnancy rate, embryo transfer.

AGRADECIMENTOS

Para a execução deste trabalho várias pessoas contribuíram de alguma maneira. Considero que todas essas ajudas foram fundamentais. A todas essas pessoas o meu “Muito Obrigado”.

Agradeço:

- Aos Profs. Drs. António Ribeiro Filho e Marcos Challoub pelos conhecimentos partilhados, pela paciência, exigência, motivação, esclarecimentos a qualquer hora e por todo o apoio e amizade. Ao Prof. Dr. António Ribeiro Filho agradeço ainda ter aceite ser meu orientador.
- À Prof. Marina Fraústo da Silva, que se disponibilizou de imediato para me co-orientar no Estágio e que em muito me ajudou em todo o processo.
- Ao Dr. Viktor Alexander Andrade pela sua disponibilidade na procura do Estágio.
- Ao Prof. Doutor Luís Costa e ao Doutor João Chagas e Silva pelos conhecimentos mais recentes.
- À Daniela Freitas, ao Raul Santana e ao Alexandre Silva que me ajudaram na pesquisa e recolha de dados.
- À Lívia, ao Danilo, à Alexandra, à Luana e ao Leandro por toda a ajuda, apoio nos momentos difíceis e companhia nos momentos de diversão.
- Ao meu primo José de Alpuim e à sua mulher Beatriz, pelo apoio durante estes últimos 4 meses. Sem eles este estágio nunca teria acontecido.
- Aos meus pais e irmãos, pelas oportunidades, por me apoiarem sempre nas minhas decisões e por me terem ajudado a superar todos os obstáculos ao longo destes 5 anos de curso, depositando total confiança em mim.
- À Mafalda, à Joana, à Leonor, à Frederica, à Catarina, à Marta, à Anita, à Zélia, ao Manel, ao Zé Maria e ao Romão por todos os anos de amizade e pela contribuição que deram para a minha formação.

- Ao Vasco, por ter estado ao meu lado durante estes 5 anos, por ter estado sempre disponível para me ajudar em tudo o que precisei, por toda a paciência e compreensão.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	I
Índice Geral.....	III
Índice de Tabelas.....	V
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Abreviaturas e Símbolos.....	VII

1ª PARTE

1-DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO.....	1
1.1- Actividades Teóricas	1
1.2-Actividades Práticas	2
1.3- Participação nas Actividades.....	4

2ª PARTE

1- INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DAS RECEPTORAS DE EMBRIÕES (<i>BOS TAURUS</i> OU <i>BOS INDICUS</i>) SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO	5
1.1- Introdução	5
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1-Transferência de Embriões	7
2.2-Ciclo Éstrico Bovino	8
2.3- Dinâmica Folicular.....	12
2.4-Sincronização do Ciclo Éstrico	13
2.5- Superovulação	18
2.6- Selecção das Dadoras.....	19
2.7- Selecção das Receptoras.....	20
2.8- Inseminação Artificial	21
2.9- Recolha de Embriões.....	21
2.10- Avaliação das Estruturas.....	23
2.11- Transferência de Embriões.....	25
2.12- Implantação Embrionária e Reconhecimento Materno da Gestação	26
2.13- Alguns Factores que Influenciam a Taxa de Gestação em Receptoras de Embriões Bovinos	28
2.14- Diferenças entre as Espécies <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i>	30
.....2.15- Raça Nelore (<i>Bos indicus</i>).....	33

3- MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1- Os Animais.....	35
3.1a- Receptoras.....	35
3.2- Tratamento Superovulatório e Inseminação Artificial das Dadoras.....	36
3.3- Recolha dos Embriões.....	37
3.4- Preparação das Receptoras e Transferência.....	38
3.5- Diagnóstico de Gestação.....	39
3.6- Análise Estatística.....	39
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5- CONCLUSÃO.....	45
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
7- BIBLIOGRAFIA.....	47
7.1- Bibliografia Citada.....	47
7.2- Outras Fontes Bibliográficas Consultadas.....	52

ÍNDICE DE TABELAS E GRÁFICOS

TABELA 1- Critérios para avaliação de embriões bovinos segundo os parâmetros de qualidade propostos pela IETS (1998).24

TABELA 2- Principais diferenças na fisiologia reprodutiva de fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*.32

TABELA 3- Tabela descritiva da influência do genótipo na taxa de gestação.....40

TABELA 4- Médias ajustadas, erro padrão e valores de F e p, para os efeitos do genótipo da receptora, fase de desenvolvimento embrionário, qualidade do embrião, dificuldade de passagem do cervix, e interação genótipo*fase na taxa de gestação (coeficiente de determinação do modelo = 0.142, $p < 0.0001$).41

ÍNDICE DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-. Alterações hormonais no ciclo éstrico de bovinos.	12
FIGURA 2- Ondas de crescimento folicular durante o ciclo éstrico da vaca.	13
FIGURA 3- Fórmula estrutural da PGF2 α	15
FIGURA 4- Fórmula estrutural da progesterona.	17
FIGURA 5 – Recolha de embriões em bovinos (representação esquemática).	23
FIGURA 6– Representação esquemática dos estádios de desenvolvimento embrionário em bovinos, considerando-se os códigos recomendados pela IETS (1998).....	24
FIGURA 7– Colocação do embrião numa palhinha de 0,25ml.....	25
FIGURA 8-. Esquema representativo do início da gestação em vacas.....	28
FIGURA 9- <i>Bos indicus</i>	32
FIGURA 10- <i>Bos taurus</i>	32
FIGURA 11– Protocolo de sincronização e superovulção em dadoras.....	37
FIGURA 12- Protocolo de sincronização em receptoras.	38

ÍNDICE DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

%.....	Porcentagem
°C.....	Graus Celsius
BA.....	Bahia
BE.....	Benzoato de Estradiol
bid.....	Duas vezes ao dia
CC.....	Condição Corporal
CL.....	Corpo Lúteo
cm.....	Centímetro
D.....	Dia
eCG.....	Gonodotrofina Coriônica Equina
FENAGRO.....	Feira Agropecuária do Estado da Bahia
FIV.....	Fecundação in vitro
FSH.....	Hormona Folículo Estimulante
g.....	Grama
GERA.....	Grupo de Estudo de Reprodução Animal
GnRH.....	Hormona Libertadora de Gonodotrofina
IA.....	Inseminação Artificial
IATF.....	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IETS.....	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IM.....	Intramuscular
INF- τ	Interferão-tau
Kg.....	Quilograma
LH.....	Hormona Luteinizante
ml.....	Mililitro
mm.....	Milímetro
P4.....	Progesterona
PBS.....	Solução Salina Fosfato-Tamponada
PGF _{2α}	Prostaglandina F2 alfa
SAS.....	Statistical Analysis System
SBTE.....	Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões
TE.....	Transferência de Embriões
TETF.....	Transferência de Embriões em Tempo Fixo
UFBA.....	Universidade Federal da Bahia
χ^2	Qui-quadrado
ZP.....	Zona Pelúcida

1ª PARTE

1-DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO

O Estágio Final Curricular realizado sob a orientação do Professor Doutor António de Lisboa Ribeiro Filho no período de 3.09.2007 a 20.12.2007 decorreu na Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil, na área de Reprodução de Grandes Animais.

As actividades teóricas tiveram lugar na cidade de Salvador da Bahia (BA), nomeadamente no Laboratório de Embriologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UFBA, enquanto que a parte prática foi realizada em algumas cidades do interior do estado da Bahia e nos arredores de Salvador.

1.1- ACTIVIDADES TEÓRICAS

- Participação como discente, nas aulas teóricas da disciplina de Inseminação Artificial em Bovinos e Andrologia, leccionada pelo Prof. Dr. António de Lisboa Ribeiro Filho, com a duração total de 120 horas, nas quais foram abordados os seguintes temas:

- Protocolo de superovulação em dadoras da espécie bovina;
- Protocolo de sincronização de dadoras e receptoras da espécie bovina;
- Inseminação artificial em tempo fixo (IATF);
- Transferência de embriões (TE) em bovinos;
- Anatomia e fisiopatologia da reprodução do macho;
- Métodos de recolha de sémen bovino;
- Patologia espermática;
- Abordagem das vantagens e desvantagens da fecundação *in vitro* (FIV) de embriões e transferência de embriões;

- Participação no Curso Teórico-Prático de Ecografia em Bovinos e Equinos, realizado de 05.11.2007 a 10.11.2007, em Salvador (BA), pelo Prof. Dr. José Carlos de Andrade Moura, com a duração total de 57 horas. Na parte prática, com a duração de 12 horas cada participante do curso realizou 3 ecografias de diagnóstico reprodutivo em vacas e éguas. Na parte teórica foram abordados os seguintes temas:

- Composição e funcionamento de um ecógrafo;
- Como ler e interpretar imagens ecográficas;
- Como seleccionar o equipamento ideal;

- Cuidados com o equipamento ecográfico;
 - Exame ginecológico;
 - Dinâmica folicular;
 - Ciclo éstrico;
 - Variações na fisiologia ovárica;
 - Patologias do ovário;
 - O útero não grávido;
 - Desenvolvimento embrionário e fetal;
 - Puerpério;
 - Quistos endometriais;
 - Endometrite e piómetra;
 - Exame andrológico.
- Participação no Grupo de Estudo de Reprodução Animal (GERA), com a duração total de 15 horas, no qual foram apresentados e discutidos temas, como:
- Diferenças entre a fisiologia reprodutiva de fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*;
 - Fisiologia reprodutiva de fêmeas caprinas;
 - Fisiologia reprodutiva de fêmeas ovinas;
 - Fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas;
 - Fisiologia reprodutiva de fêmeas equinas;
 - Foliculogenese antral;
 - Foliculogenese pré-antral;
 - Fecundação *in vitro*;
 - Sexagem de sémen.

1.2-ACTIVIDADES PRÁTICAS

- Realização de diagnóstico de gestação e exame ginecológico por palpação rectal e com o auxílio de aparelho de ecografia por via transrectal, em animais da raça Nelore,
- Diagnóstico de gestação por ecografia de animais da raça Nelore destinados às provas de pista da Feira Agropecuária do Estado da Bahia (FENAGRO);
- Realização de sexagem fetal em bovinos, através da visualização do tubérculo genital cerca dos 60 dias de gestação, por ecografia transrectal;

- Realização de recolha de embriões em bovinos através do método não cirúrgico, por lavagem uterina;
- Classificação e selecção de embriões bovinos, em conformidade com as orientações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS);
- Transferência de embriões bovinos colhidos em receptoras cruzadas através do método não cirúrgico;
- Sincronização de receptoras cruzadas e avaliação da resposta ao protocolo das mesmas através de palpação rectal e ecografia transrectal, para determinação dos animais a serem utilizados;
- Exame andrológico em touros da raça Nelore;
- Recolha de sémen de bovinos através de electroestimulação;
- Realização do teste de termoresistência em sémen congelado de bovinos da raça Nelore;
- Realização de testes de patologia e concentração espermática, em bovinos da raça Nelore;
- Realização de provas de rastreio de tuberculose, através do teste de sensibilidade à tuberculina, em vacas da raça Nelore;
- Realização de provas de rastreio de brucelose, pela prova rápida, utilizando o corante Rosa de Bengala, em vacas da raça Nelore;
- Realização de recolha de embriões e posterior transferência pelo método cirúrgico de laparotomia médio-ventral, em cabras da raça Bôer;
- Cirurgia de correcção de prolapso rectal e posterior tratamento numa ovelha da raça Dorper;
- Cirurgia de remoção de um testículo e posterior tratamento num carneiro da raça Dorper;

- Recolha de sémen de ovinos através de electroestimulação;
- Participação nos julgamentos de pista da FENAGRO.

1.3- PARTICIPAÇÃO NAS ACTIVIDADES

Em todas as actividades práticas realizadas, foi-me possível participar activamente, tanto nas recolhas e transferências de embriões, como em todo o processo de avaliação e classificação das estruturas embrionárias. Tive oportunidade de realizar exames ginecológicos e andrológicos, diagnósticos de gestação em vacas por palpação rectal ou por ecografia e sexagem fetal. Ainda na parte realizada no campo, pude colher sangue para posterior rastreio de brucelose, realizar provas de sensibilidade à tuberculina e fazer recolhas de sémen.

No laboratório, efectuei exames de rastreio de brucelose, provas de patologia e concentração espermática e testes de termoresistência em sémen congelado. Por último, pude participar nas cirurgias e nos tratamentos efectuados aos animais.

2ª PARTE

1- INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DAS RECEPTORAS DE EMBRIÕES (*BOS TAURUS* OU *BOS INDICUS*) SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO

1.1- INTRODUÇÃO

Entre as tecnologias reprodutivas disponíveis no sector pecuário, encontra-se a transferência de embriões. Esta é uma técnica que facilmente se poderá tornar numa das mais utilizadas, devido à facilidade de aplicação em condições práticas e de ter uma boa relação custo-benefício, já que a partir de uma dadora de alto valor genético se pode conseguir um grande número de embriões por ano.

Neste contexto, a Medicina Veterinária empenhou-se profundamente no sentido de melhorar a aplicabilidade das técnicas da reprodução. Assim, a transferência de embriões em bovinos tem obtido consideráveis avanços nos últimos anos (Demczuk *et al.*, 1998).

Apesar das suas vantagens a TE ainda apresenta limitações, tais como a variabilidade nas respostas aos tratamentos hormonais e os esforços necessários para a realização destes que restringem consideravelmente a sua difusão. Além disto, a selecção e o maneo adequado das receptoras de embriões são imprescindíveis para o sucesso dos programas de TE, uma vez que a mortalidade embrionária após a transferência é ainda significativa e limita de sobremaneira a eficiência desta técnica (Bó *et al.*, 2002).

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 215 milhões de cabeças, sendo a maioria representada por animais da espécie *Bos indicus* (IBGE, 2005). É um dos países do mundo onde a técnica de TE em bovinos mais evoluiu nos últimos 10 anos, encontrando-se em 2º lugar na aplicação da técnica nas estatísticas de 2002 da IETS.

Aproximadamente 70.000 embriões bovinos são transferidos anualmente no Brasil, quantidade apenas inferior aos 176.000 embriões transferidos nos EUA (Thibier, 2001).

Assim, com preços competitivos, investimentos em tecnologia e melhoramento genético, o Brasil poderá ter um papel bastante significativo na competição internacional no mercado de carne bovina (USDA, 2003).

Em 2006, Portugal possuía um rebanho de 1 407 000 cabeças, correspondente a 1,37% do efectivo bovino total da União Europeia composto apenas por vacas da espécie *Bos taurus* (Anuário Estatístico de Portugal, 2006).

Em Portugal a TE tem-se desenvolvido de forma modesta, ao contrário do Brasil. Algumas explorações particulares de bovinos leiteiros e de carne, têm recorrido à TE com um carácter de continuidade, e vários estudos aplicativos com raças autóctones, assim como trabalhos de investigação nesta área têm sido desenvolvidos por técnicos nacionais (Chagas e Silva, 2001).

A vaca leiteira da raça Frisia tem-se revelado o alvo mais significativo e, deste modo a técnica tem vindo a ser utilizada no programa de melhoramento genético da bovinicultura leiteira (Chagas e Silva, 2004).

O uso da transferência de embriões, conjuntamente com outras tecnologias relacionadas, promove o aumento de descendentes geneticamente superiores. Entretanto, para que estas tecnologias se tornem acessíveis a uma larga base de criadores é necessário um maior desenvolvimento a nível clínico, a fim de aumentar a eficiência e reduzir os custos (Galli *et al.*, 2003).

Assim, dada a importância desta tecnologia nos últimos anos no melhoramento genético dos rebanhos bovinos, é importante conhecer as diferenças fisiológicas existentes entre cada espécie para que melhor se possam aproveitar os diferentes protocolos.

Este trabalho tem por objectivo, estudar se as diferenças entre as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus* influenciam a taxa de gestação de receptoras de embriões, de maneira a entender se estas interferem na aplicabilidade das tecnologias reprodutivas.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A Transferência de Embriões é uma ferramenta que possibilita aumentar o potencial reprodutivo de fêmeas consideradas excepcionais, utilizada principalmente como instrumento para acelerar o progresso dos programas de selecção animal (Rodrigues, 2001).

Assim, a TE é uma tecnologia na qual são colhidos embriões de uma fêmea dadora sendo depois transferidos para fêmeas receptoras para completarem o período de gestação (Zanega, 1987).

É uma técnica com difusão a nível mundial, que apresenta como principal vantagem a possibilidade de aumentar a capacidade reprodutiva de uma fêmea geneticamente superior, através da produção de um número de descendentes superior ao que seria possível obter fisiologicamente, durante a sua vida reprodutiva (Nagano, 2004).

A TE oferece uma série de vantagens para a selecção zootécnica com consequentes reflexos sobre a produção animal (Gonsalves *et al.*, 2002a).

Desta forma permite:

- Aumentar o número de descendentes de animais de alto valor genético;
- Gestações gemelares;
- Descendentes com características pré-determinadas;
- A venda de material genético, para importação e exportação;
- A criopreservação de embriões, com formação de bancos de embriões e reserva de material genético;
- O controlo de transmissão de doenças infecto-contagiosas.

No entanto, a TE requer alguns procedimentos sofisticados, mão-de-obra especializada e um conjunto de actividades necessárias para que se possa realizar com sucesso.

As principais etapas da TE em bovinos são: (Gonsalves *et al.*, 2002a)

- Identificação da fase do ciclo éstrico e conhecimento da dinâmica folicular;
- Tratamento hormonal para superovular as dadoras e sincronizar o ciclo éstrico das dadoras e das receptoras;

- Selecção zootécnica das dadoras e avaliação clínico-ginecológica das dadoras e das receptoras;
- Observação do estro das dadoras e das receptoras quanto à regularidade e intensidade;
- Inseminação Artificial (IA) das dadoras;
- Recolha e manipulação dos embriões;
- Avaliação e classificação das estruturas colhidas;
- Transferência de embriões.

2.2-CICLO ÉSTRICO BOVINO

O conhecimento da fisiologia reprodutiva de uma espécie é fundamental para o emprego de tecnologias como a transferência de embriões e a sincronização do estro (Gioso *et al.*, 2005).

O ciclo éstrico é definido como as modificações cíclicas que ocorrem a nível comportamental, uterino e ovárico nas fêmeas desde a puberdade até ao fim da sua vida. No contexto da TE, o conhecimento destas modificações é útil para a detecção e sincronização do estro, superovulação, inseminação artificial e transferência de embriões (Hafez e Hafez, 2004).

A puberdade é a idade a partir da qual os órgãos sexuais iniciam a sua função. É o momento em que ocorre o primeiro estro acompanhado de ovulação. A idade do início da puberdade pode variar em função da raça e da velocidade de crescimento (Hafez e Hafez, 2004a). A alimentação, o peso corporal, o ganho de peso vivo e a estação do ano também podem afectar o momento do aparecimento da puberdade (Ball e Peters, 2006a).

Em termos médios estima-se que a puberdade se inicie em fêmeas *Bos taurus* entre os 9 e os 15 meses de idade. Por outro lado em *Bos indicus*, espécie caracteristicamente mais tardia, a puberdade pode surgir fisiologicamente até aos 24 meses (Gregory, 1987).

As vacas são animais poliéstricos contínuos, o que significa que uma vez estabelecidos os ciclos éstricos, estes repetem-se ao longo do tempo, excepto quando interrompidos pela gestação, por efeitos de ordem nutricional (restrição alimentar) ou por alguma patologia (Gregory, 1987).

Cada ciclo éstrico dura entre 18 a 24 dias, com uma periodicidade média normal de 21 dias entre cada ciclo.

O ciclo éstrico, é classicamente dividido em 4 fases (Gregory, 1987):

- Próestro com duração de 3 dias;
- Estro com duração de até 18 horas;
- Metaestro com duração de 2 a 3 dias;
- Diestro com duração de 14 dias.

O próestro e o estro correspondem à fase folicular do ciclo, enquanto o metaestro e o diestro correspondem à fase luteínica.

Próestro (Gregory, 1987; Gonsalves *et al.*, 2002b; Ball e Peters, 2002a):

No proestro, as alterações comportamentais podem passar despercebidas. No entanto, o touro consegue detectar a proximidade do estro.

No exame ginecológico pode-se observar o início da edemaciação vulvar e o aumento da secreção do muco vaginal.

Na palpação rectal, sente-se o aumento da contractilidade e do tónus uterino, devido à congestão vascular do endométrio.

No ovário, ocorre a regressão do corpo lúteo e o desenvolvimento do folículo de Graaf que se encontra flutuante.

Esta fase é marcada pelo aumento gradual de estrogénio (estradiol-17 β) na circulação, devido ao início do desenvolvimento folicular.

Estro (Gregory, 1987; Ball e Peters, 2002b; Gonsalves *et al.*, 2002a):

É o período no qual a fêmea está inquieta e aceita ser montada por um macho ou por outras fêmeas. Apresenta movimentos anais rítmicos, muco vaginal, aumento da temperatura vaginal e edemaciação da mucosa vulvar.

A sua duração depende, entre outros factores, da raça. Assim, em *Bos indicus* tem uma duração muito curta de aproximadamente 10 horas, enquanto que em *Bos taurus* pode durar até 18 horas.

Na palpação rectal, um dos ovários tem um grande folículo de Graaf flutuante e no mesmo ovário ou no outro está um corpo lúteo atrésico (cicatriz fibrosa).

O útero apresenta grande contractibilidade.

Os níveis de estrogénio (estradiol-17 β) continuam elevados.

Metaestro (Gregory, 1987; Gonsalves *et al.*, 2002b; Ball e Peters, 2002a):

Geralmente, não se observam alterações comportamentais.

Inicia-se 6 a 12 horas depois da manifestação do estro e corresponde à ovulação. Termina quando o corpo lúteo atinge a sua capacidade de produção de progesterona.

Nos ovários ocorre o crescimento do corpo lúteo depois da ovulação e o útero não se encontra tão contraído, devido à produção inicial de progesterona.

Diestro (Gregory, 1987; Gonsalves *et al.*, 2002b; Ball e Peters, 2006a):

É considerada a fase de repouso sexual e é a de maior duração.

O tracto genital encontra-se sob influência da progesterona produzida pelo corpo lúteo.

Termina quando ocorre a regressão fisiológica do corpo lúteo, se não houver fecundação, dando início ao próximo ciclo.

Alterações endócrinas:

Para que as alterações comportamentais, uterinas e ováricas ocorram é necessário que haja alterações endócrinas.

Assim, o ciclo éstrico na sua fase folicular é iniciado pela libertação da Hormona Gonadotrófica (GnRH) pelo hipotálamo, que por sua vez, por via hipotalâmica-

hipofisária, causa a libertação da Hormona Folículo Estimulante (FSH) pela glândula pituitária anterior, estimulando o crescimento folicular e dando início à primeira onda de crescimento folicular (Ball e Peters, 2006a).

Durante o crescimento folicular são recrutados folículos primários (folículos primordiais), que se desenvolvem até cerca dos 4 mm de diâmetro. Porém, apenas um se torna maduro (folículo dominante), por resposta aos níveis crescentes de FSH, atingindo um diâmetro de até 17 mm (Baruselli *et al.*, 2007).

O folículo dominante produz inibina e estrogénio (estradiol-17 β). A inibina, inibe a secreção de FSH, parando o crescimento dos outros folículos recrutados, que acabam por sofrer atresia. Enquanto o estradiol-17 β , cuja produção é regulada pela insulina, inicia o comportamento éstrico, prepara o tracto reprodutivo para os processos associados à reprodução e inicia uma resposta de feedback positivo no hipotálamo, provocando uma nova libertação de GnRH para a glândula pituitária, induzindo a libertação da Hormona Luteínizante (LH) (Hafez e Hafez, 2004b).

Quando a libertação de LH ocorre em episódios de alta amplitude e baixa frequência, por influência do alto nível plasmático de progesterona, o folículo dominante não consegue trocar o mecanismo de dependência de FSH por LH, acabando por sofrer atresia (Ribeiro Filho, 2007). Pelo contrário, quando a libertação de LH ocorre em episódios de alta frequência e baixa amplitude e as concentrações plasmáticas de progesterona se encontram baixas, as concentrações plasmáticas de LH estão elevadas, pelo que o folículo se torna dependente desta, o que conduz ao processo de maturação folicular com consequente ovulação (Ribeiro Filho, 2007).

Na fase luteínica, a LH promove a ovulação e é responsável pela luteinização (formação do corpo lúteo) do folículo depois da ovulação (Hafez e Hafez, 2004b).

Com a formação do corpo lúteo (CL) há secreção de progesterona. Esta tem a função de preparar o tracto reprodutivo para a implantação do embrião, ou pode ter acção sobre o hipotálamo e, por feedback negativo inibir a libertação de GnRH, impedindo a ovulação (Ball e Peters, 2006a).

Caso a fêmea não tenha ficado gestante no estro anterior, o corpo lúteo, cerca de 10 a 15 dias após a sua formação, iniciará a produção de ocitocina, que no endométrio estimulará a produção de prostaglandina F2 alfa (PGF_{2 α}), responsável pela lise do

corpo lúteo, processo conhecido como luteólise. Assim, a concentração plasmática de progesterona diminui, possibilitando aumentos graduais de GnRH, FSH e LH, permitindo iniciar um novo ciclo (Hafez e Hafez, 2004b).

Caso o animal fique gestante, o corpo lúteo não poderá sofrer regressão, pois é a principal fonte de progesterona no início da gestação em todas as espécies domésticas. O bloqueio da luteólise é feito por substâncias produzidas pelo feto, que inibem a produção e/ou acesso da prostaglandina ao ovário (Hafez e Hafez, 2004b) (Figura 1).

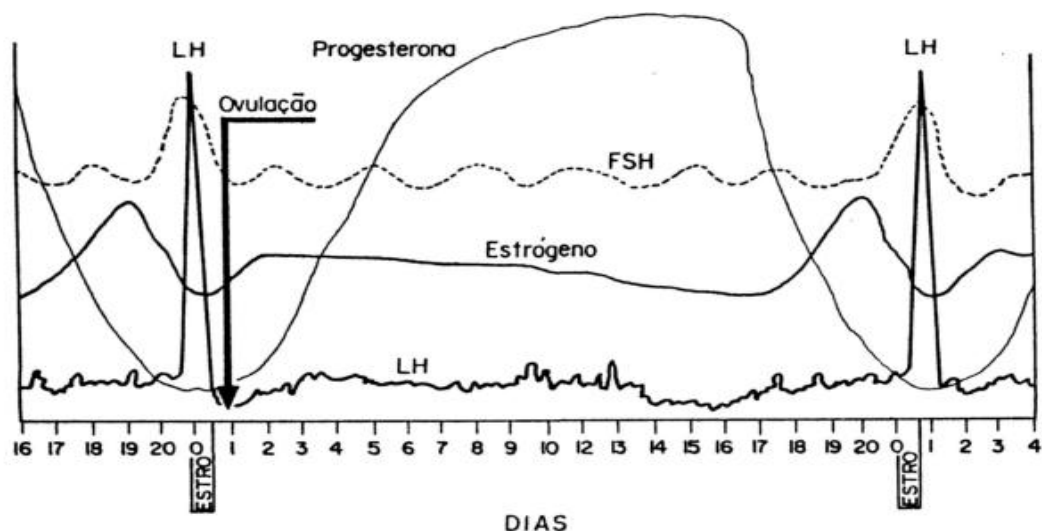


FIGURA 1-. Alterações hormonais no ciclo éstrico de bovinos (Pineda, 1999).

2.3- DINÂMICA FOLICULAR

O desenvolvimento folicular de bovinos ocorre num padrão de ondas, sendo mais frequente em *Bos indicus* a ocorrência de duas a três, e às vezes quatro ondas de desenvolvimento folicular (Bó *et al.*, 2003).

Cada onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de três a seis folículos com diâmetro igual ou maior a cinco milímetros, que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum de cerca de três dias (Ginther *et al.*, 2003).

Destes, apenas um continua o seu desenvolvimento (folículo dominante), enquanto os outros diminuem de tamanho até sofrerem atresia (folículos subordinados), dando-se o

fenômeno de divergência folicular. O crescimento de folículos maiores de quatro milímetros depende da FSH, enquanto os folículos com diâmetro maior que nove milímetros transferem as suas necessidades gonadotróficas para a LH (Fortune, 1993).

A manutenção e regressão do folículo dominante estão associadas às mudanças nos níveis de progesterona e LH (Fortune, 1993).

Geralmente, na primeira e segunda ondas, depois da divergência folicular, e na presença de altos níveis de progesterona (que promove a redução da frequência na liberação de LH) o folículo dominante torna-se anovulatório. A partir desse momento começa o processo de atresia e perda de dominância, dando início a uma nova onda de crescimento folicular (Ginther *et al.*, 1989; Webb *et al.*, 1999). Nesta nova onda, o folículo dominante consegue transferir as suas necessidades de FSH para LH, formando o corpo lúteo e ovulando (Figura 2).

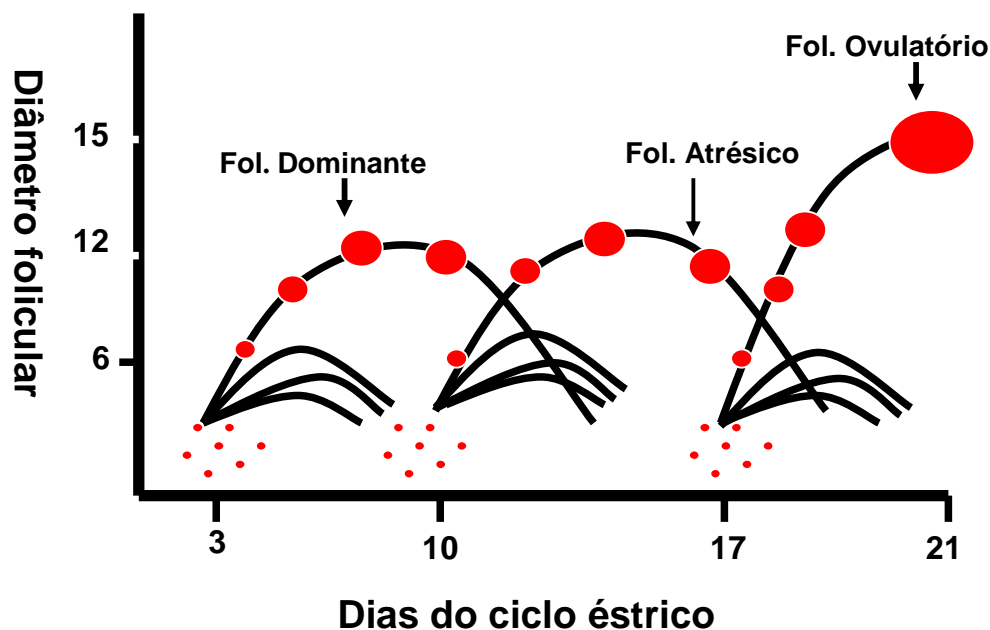


FIGURA 2- Ondas de crescimento folicular durante o ciclo estrico da vaca (Ribeiro Filho, 2007).

2.4-SINCRONIZAÇÃO DO CICLO ÉSTRICO

A sincronização do ciclo estrico consiste em diminuir ou aumentar o ciclo estrico através da utilização de hormonas ou associações hormonais, de modo a que um grupo de vacas entre em estro e/ou ovule durante um curto período de tempo, ou até

mesmo num único dia diferente do que ocorreria naturalmente (Gonsalves *et al.*, 2002a).

Uma das principais razões para a utilização de técnicas de controlo do ciclo éstrico é a de expandir a utilização das tecnologias da reprodução, permitindo deste modo acelerar o progresso genético (Ball e Peters, 2006b).

Mediante a concentração do período de manifestação de estro é possível diminuir o tempo gasto com a observação dos seus sinais, e nos casos em que se utiliza a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) eliminá-la. Assim, permite escolher a época do ano mais favorável aos trabalhos de inseminação artificial, TE e aspiração folicular com consequente FIV, maximizando a utilização da mão-de-obra disponível e melhorando a produtividade do rebanho (Hafez e Hafez, 2004c).

Num programa de Transferência de Embriões, a sincronização do ciclo éstrico das dadoras e das receptoras é muito importante, principalmente, quando se pretende concentrar as recolhas e as transferências num único dia, permitindo assim, que as dadoras e as receptoras se encontrem na mesma fase do ciclo éstrico, aumentando as possibilidades de sobrevivência do embrião (Vasconcelos, 2006).

As hormonas utilizadas no controlo farmacológico do ciclo éstrico são semelhantes às hormonas do sistema reprodutivo produzidas no hipotálamo (GnRH), no ovário (estradiol e progesterona), e no útero (PGF_{2α}) dos bovinos. A actividade biológica das hormonas exógenas tenta reproduzir a actividade das hormonas endógenas em condições normais (Lucy *et al.*, 2004).

Com a sincronização do ciclo éstrico pretende-se (Ribeiro Filho, 2007):

- Terminar a fase luteínica de forma sincronizada;
- Sincronizar a onda de desenvolvimento folicular;
- Sincronizar a ovulação.

Basicamente, existem três abordagens no controlo do ciclo éstrico em bovinos (Ball e Peters, 2006b):

- Utilização de agentes luteolíticos à base de PGF_{2α}, provocando a regressão do corpo lúteo (luteolise);
- Manipulação das funções folicular e lútea com compostos à base de prostaglandina em associação com o GnRH;

- Administração de progesterona durante vários dias, seguido de uma remoção abrupta (de modo a suprimir o estro e a ovulação, até que o corpo lúteo de todos os animais do grupo tenha regredido) conjuntamente com a administração de estrogénio (para induzir a ovulação).

Sincronização com PGF_{2α}:

A prostaglandina F2 alfa (Figura 3) é um ácido gordo hidroxilado insaturado com 20 átomos de carbono e um anel ciclopentano derivado do ácido araquidónico. É o agente luteolítico natural associado ao final da fase luteínica do ciclo éstrico, que permite o início de um novo ciclo na ausência de fertilização (Hafez e Hafez, 2004b).

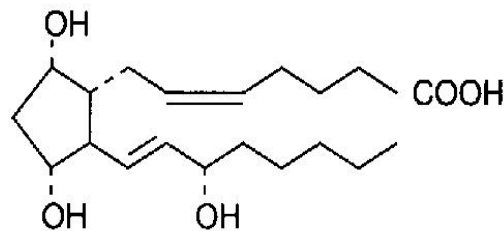


FIGURA 3- Fórmula estrutural da PGF_{2α} (Pineda, 1999).

A PGF_{2α} é o agente luteolítico mais potente. A injeção de PGF_{2α} exógena ou de um dos seus análogos (cloprostenol) durante a fase lútea média do ciclo (entre o 6º e 8º dias do ciclo éstrico) resulta na luteolise prematura e, na queda das concentrações de progesterona periférica. Consequentemente há um aumento na secreção de gonodotrofinas e de estradiol, culminando nas ondas pré-ovulatórias e na eventual ovulação (Hafez e Hafez, 2004b).

Porém, a utilização da prostaglandina apresenta limitações, uma vez que o seu sucesso depende directamente da fase do ciclo éstrico em que o animal se encontra.

O uso de PGF_{2α} na presença de um folículo dominante em fase de crescimento permite uma rápida maturação e a ovulação do mesmo, enquanto a administração no início da fase de atresia do folículo dominante necessitará de, aproximadamente, quatro a seis dias para que um novo folículo dominante se desenvolva o suficiente para induzir o estro (Savio *et al.*, 1990), apenas terminando a fase luteolítica não cumprindo os outros requisitos.

Podem ser utilizados dois métodos na administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, entre outros, um consiste em duas aplicações de $\text{PGF}_{2\alpha}$, enquanto que o outro consiste em apenas uma aplicação da hormona.

No primeiro método, são necessárias duas aplicações de prostaglandina com um intervalo de 11 dias, de maneira a evitar a fase inicial do ciclo éstrico (Embrapa Gado de Corte, 1991).

Não requer a observação de sinais de estro antes ou entre as duas aplicações, uma vez que todos os animais deverão responder após a segunda aplicação, independentemente da fase do ciclo éstrico em que se encontravam na primeira aplicação (Embrapa Gado de Corte, 1991).

Este programa tem como desvantagens os custos e o trabalho envolvidos com a administração de duas doses de prostaglandina, porém o período de observação de sinais de estro é concentrado após a segunda aplicação.

O segundo método, consiste na aplicação de uma única dose de prostaglandina, seguida da observação de sinais de estro durante 11 dias e posterior inseminação (Embrapa Gado de Corte, 1991).

Uma segunda aplicação é efectuada apenas nos animais que não manifestaram sinais de estro após a primeira aplicação. Após a segunda dose segue-se a observação de sinais de estro e inseminação (Embrapa Gado de Corte, 1991).

Este programa requer menor número de aplicações de prostaglandina, mas o período de observação de sinais de estro é maior do que no método anterior, assim como, o número de receptoras também é superior (Vasconcelos, 2007).

Associação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com GnRH:

Esta associação é utilizada para reduzir a variabilidade do momento da ovulação após o uso isolado de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

A GnRH é injectada no dia 0 do tratamento, seguida de uma injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 7 dias depois e de uma nova injeção de GnRH no 9º dia.

A administração de GnRH induzirá um pico de LH, provocando ovulação ou luteinização do folículo dominante com consequente emergência de uma nova onda folicular nos próximos 2 dias.

A administração de PGF_{2α}, 7 dias depois da primeira injeção de GnRH induz a luteólise e a segunda injeção de GnRH promove outro pico de LH, sincronizando a ovulação do novo folículo dominante (Bó *et al.*, 2004).

Porém, apenas se atingem dois objectivos, o de terminar a fase luteolítica e o de sincronizar a onda de crescimento.

Utilização de Progesterona e Estrogénio:

A progesterona (Figura 4), o progestágeno natural de maior prevalência nas fêmeas bovinas, é secretada pelas células luteínicas, pela placenta e pelas glândulas adrenais, sendo a sua secreção estimulada pela LH (Hafez e Hafez, 2004b).

Apresenta funções como preparar o endométrio para a implantação e manutenção da gestação, provocando a inibição do estro e do pico ovulatório de LH quando se encontra em níveis elevados (Hafez e Hafez, 2004b).

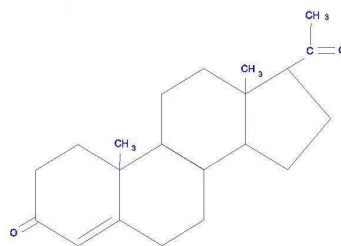


FIGURA 4- Fórmula estrutural da progesterona (Pineda, 1999).

A utilização de progesterona e dos seus análogos (acetato de melengestrol e medroxiprogesterona) consiste na sua administração por um período de 7 a 12 dias, por uma das seguintes formas: por via oral, através de dispositivos intravaginais ou por implantes auriculares, conjuntamente com a administração de estrogénio (Ball e Peters, 2006). Depois deste período, o progestágeno é removido e é administrada

PGF_{2α} e no dia seguinte uma nova dose de estrogénio. Os animais entram em cio 48 a 72 horas depois.

Desta forma, é simulada a função do corpo lúteo. A progesterona suprime a libertação de gonodotrofinas e, conseqüentemente, a maturação folicular até à sua remoção (Embrapa Gado de Corte, 1991).

Assim, é possível atingir os três objectivos de terminar a fase luteínica, sincronizar a onda de crescimento folicular e sincronizar a ovulação.

Porém, o tratamento prolongado com o uso de progesterona promove o crescimento excessivo e persistência do folículo dominante (Corteel *et al.*, 1988). Mesmo por curtos períodos de tempo (sete a dez dias), na ausência de um CL, podem ocorrer folículos persistentes (Ahmad *et al.*, 1995).

Portanto, é necessário induzir a atresia ou a ovulação do folículo dominante presente no ovário, no momento da colocação do implante, o que pode ser obtido pela administração de estradiol ou GnRH (Bó *et al.*, 2003).

2.5- SUPEROVULAÇÃO

A superovulação é a indução hormonal de ovulações múltiplas, que permite um maior número de estruturas para fertilizar, e conseqüentemente um maior número de bezerras por ano, por cada vaca de alto valor genético e económico (Gregory, 1987).

A superovulação é um dos principais requisitos para a transferência de embriões, estando o sucesso da técnica directamente relacionado com o número e a qualidade dos embriões obtidos de cada dadora.

A hormona folículo estimulante (FSH) tem uma função essencial no desenvolvimento dos folículos, pelo que a FSH exógena é utilizada nos protocolos de superovulação (Hafez e Hafez, 2004b).

Folículos em diferentes estadios de desenvolvimento estão presentes nos ovários, e grupos consecutivos de folículos crescem, maturam e degeneram ou ovulam. A FSH tem como função estimular o crescimento dos folículos pequenos. Como tal, a FSH

exógena reverte a atresia dos folículos com mais de 1,77mm de diâmetro (Baruselli *et al.*, 2007).

O tratamento superovulatório deve ser realizado no início de uma onda folicular, antes da selecção do folículo dominante, para que se obtenha uma melhor resposta (Gonsalves *et al.*, 2002a).

O tratamento superovulatório é efectuado através de injeções de FSH exógena, para estimular os folículos adicionais. A FSH exógena não promove o desenvolvimento folicular, mas fornece um meio hormonal adequado à continuação dos processos de maturação, dos folículos que normalmente se tornariam atresícos, permitindo a ovulação destes (Gonsalves *et al.*, 2002a).

Assim, o tratamento superovulatório é iniciado no diestro, e a FSH exógena é administrada em duas doses diárias decrescentes, entre os dias 5 e 8 do tratamento.

2.6- SELECÇÃO DAS DADORAS

A selecção de uma dadora é um dos pontos críticos na TE, uma vez que devem ser utilizados animais sem distúrbios reprodutivos, com ciclo éstrico regular e com um estado nutricional adequado (Gregory, 1987).

Os animais dadores devem ser de alto valor genético, para que possam passar as suas características aos descendentes, e assim melhorar a qualidade do rebanho. Devem ter uma produção superior à média e características anatomo-fisiológicas excepcionais (Ball e Peters, 2006c).

As vacas dadoras devem ser oriundas de explorações com rebanhos hígidos, sem qualquer relato, pelo menos nos últimos seis meses, de casos clínicos infecto-contagiosos, como brucelose, tuberculose, leucose entre outros (Gonsalves *et al.*, 2002a).

Para a selecção destes animais dadores, deve saber-se a história clínica reprodutiva, ou seja, qual o número de crias, se o ciclo reprodutivo é normal ou não, se teve problemas no parto, qual o puerpério, se tem boa capacidade maternal, e qual o intervalo médio entre partos, entre outros factores (Gregory, 1987).

Também deve ser realizado um exame de estado geral, para verificar se existem alterações dos sistemas locomotor, digestivo, urinário e circulatório. O exame ginecológico é muito importante para observar se há alterações de origem uterina ou ovárica. Este pode ser realizado por palpação rectal, para ver a passagem pelo canal cervical, se o útero está simétrico ou assimétrico, a espessura da parede e a disposição dos cornos uterinos na cavidade pélvica. Os ovários também são examinados quanto ao tamanho, consistência e presença de estruturas anormais. Também se pode realizar uma vaginoscopia. Porém, esta é utilizada como um meio de diagnóstico quando existem dúvidas em relação à palpação rectal (Gregory, 1987). Este exame também pode ser realizado com o auxílio da ecografia.

O estado vacinal e o programa de desparasitação contra ecto e endoparasitas devem ser verificados.

Por último, é de extrema importância o estado nutricional, pois se as vacas estiverem excessivamente gordas ou magras a sua resposta aos tratamentos hormonais poderá não ser satisfatória (Gregory, 1987).

2.7- SELECÇÃO DAS RECEPTORAS

As receptoras constituem uma parte fundamental de um programa de TE porque necessitam de manter a gestação. A aquisição destes animais é, geralmente, de custo elevado, a manutenção dispendiosa e o estado de saúde é crítico para o êxito da TE (Gonsalves *et al.*, 2002a).

As receptoras devem ter uma condição física satisfatória, devem ser férteis, apresentar uma condição corporal adequada, os ciclos éstricos devem ser regulares e devem estar livres de doenças (Gregory, 1987).

Geralmente, para receptoras devem ser escolhidas as vacas que melhor se adaptem ao meio e que exibam boas características maternas.

A receptora deve ter um porte compatível com a raça da dadora, para que sejam conseguidos uma gestação e um parto normais. A produção de leite deve ser suficiente para amamentar e permitir que a cria se desenvolva normalmente. Para as transferências realizadas em gado de aptidão cárnica, dá-se preferência a vacas entre os 3 e 7 anos, principalmente se já tiverem um histórico de gestação, parto e

amamentação do bezerro (Gregory, 1987). Enquanto que em gado de aptidão leiteira, é preferível a escolha de novilhas sem histórico de gestação.

Porém, a selecção final de uma fêmea como receptora só ocorre no dia da própria transferência, em função principalmente, dos sintomas de estro evidenciados após a sincronização e da avaliação do corpo lúteo (Gonsalves *et al.*, 2002a).

2.8- INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A inseminação artificial é realizada em duas vezes, a primeira inseminação 12 horas depois da observação do cio, e a segunda inseminação 12 horas depois da primeira, isto quando ocorre observação dos sinais de estro. Quando ocorre inseminação artificial em tempo fixo e a sincronização do estro é realizada pela administração de progesterona, esta ocorre 56 horas depois da remoção do implante de progesterona sem que haja observação dos sinais de estro (Ribeiro Filho, 2007).

2.9- RECOLHA DE EMBRIÕES

A recolha de embriões pode ser realizada de forma cirúrgica ou não cirúrgica.

A forma cirúrgica é realizada através de laparotomia médio-ventral, porém é bastante demorada e acarreta os riscos de uma laparotomia em bovinos e também de infertilidade, causada pelas aderências no útero e nos ovários (Zanega, 1987).

A recolha não cirúrgica, a mais praticada em bovinos nos dias de hoje, é realizada pelo método transcervical, e pode ser definida como o acto de extrair os embriões contidos no útero da dadora, mediante sucessivas infusões e retiradas de meio líquido (Zanega, 1987).

A recolha deve ser efectuada, preferencialmente, entre os 6º e 8º dias após a primeira inseminação da dadora, visto que, este é o período mais indicado para a obtenção de embriões nos estádios de mórula ou blastocisto (Gonsalves *et al.*, 2002a), estruturas ideais para a transferência imediata, bissecção ou criopreservação.

A recolha é realizada, utilizando um catéter de Folley de 2 ou 3 vias, que se encontra ligado a um sistema de mangueiras fechado, cujas pontas estão ligadas ao PBS (Solução Salina Fosfato-Tamponada) ao filtro e ao catéter. O catéter de Folley pode

ter 18 a 24 mm de diâmetro (consoante o diâmetro do canal cervical) e está provido de um mandril de aço (para torná-lo rígido). O PBS deve ser aquecido à temperatura de 37 °C e o filtro deve estar tapado (para proteger os embriões da radiação solar) e ligado a um recipiente de recolha do líquido excedente.

Antes da recolha, o local deve ser limpo os materiais devem estar esterilizados, e a dadora deve ser preparada.

Preparação da dadora (adaptado de Zanega, 1987; Hafez e Hafez, 2004c):

- Colocar a dadora no tronco de contenção;
- Aplicar 0,5 ml de acepromazina e administrar a anestesia epidural baixa com 5 ml de lidocaína;
- Fazer palpação rectal do tracto genital, para verificar o número de CL de cada ovário (o qual corresponde, geralmente, ao número de estruturas colhidas);
- Proceder ao esvaziamento do recto e à lavagem da vulva, ânus e áreas adjacentes, com solução iodada e álcool a 70%;
- Introduzir o catéter de Folley até ao primeiro terço do corno uterino. Se o cérvix for muito estreito ou tortuoso, pode-se utilizar um expansor cervical, para facilitar a passagem do catéter;
- Atingida a profundidade desejada, o balão do catéter é cheio com aproximadamente 10 a 12ml de ar e o mandril é retirado;
- Todo o processo é auxiliado através da palpação rectal.

Depois de preparada a dadora, segue-se a recolha propriamente dita (Figura 5). Inicia-se a recolha permitindo a entrada de PBS por força da gravidade no corno uterino. O operador deve regular a velocidade de entrada do líquido para que seja suave. Enquanto o corno é cheio, segura-se no corpo uterino (por palpação rectal) para impedir a saída de líquido.

Durante o esvaziamento do corno uterino, aplica-se uma suave massagem (por palpação rectal), para deslocar os embriões. Cada corno deve ser cheio pelo menos 4 vezes com cerca de 60 a 100 ml de PBS, dependendo da dimensão do corno uterino. Finalizada a operação de um lado, repete-se o processo do lado oposto.

O procedimento tem a duração de aproximadamente 30 minutos, e no total utilizam-se 600 a 1000 ml de PBS em cada dadora.

Terminada a recolha administra-se 2 ml de PGF2 α , para promover a regressão dos CL e prevenir a gestação, caso fiquem um ou mais embriões fazendo com que a dadora reinicie o ciclo normal.

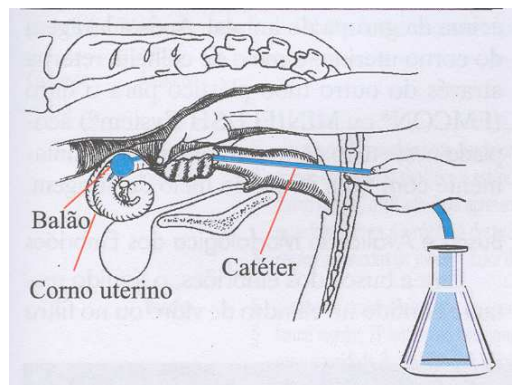


FIGURA 5 – Recolha de embriões em bovinos (representação esquemática) (Gonsalves *et al.*, 2002a).

2.10- AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS

Depois da recolha, o líquido contido no filtro é colocado em placas de Petri com 12 cm de diâmetro. A procura e a selecção são realizadas com auxílio de um estereomicroscópio. Os embriões encontrados são transferidos para placas de Petri com 3 cm de diâmetro com PBS enriquecido, onde devem estar protegidos da luz e a temperatura ambiente. Terminada a pesquisa, inicia-se a classificação dos embriões (Ribeiro Filho, 2007).

A avaliação embrionária consiste na identificação do estágio de desenvolvimento celular (Figura 6) e na avaliação da qualidade do embrião (Tabela 1), baseada nas características morfológicas (Gonsalves *et al.*, 2002a).

O aspecto morfológico dos embriões é de extrema importância, uma vez que, permite prever a viabilidade do embrião e consequentemente a obtenção de altos índices de gestação nas fêmeas receptoras (Gonsalves *et al.*, 2002a).

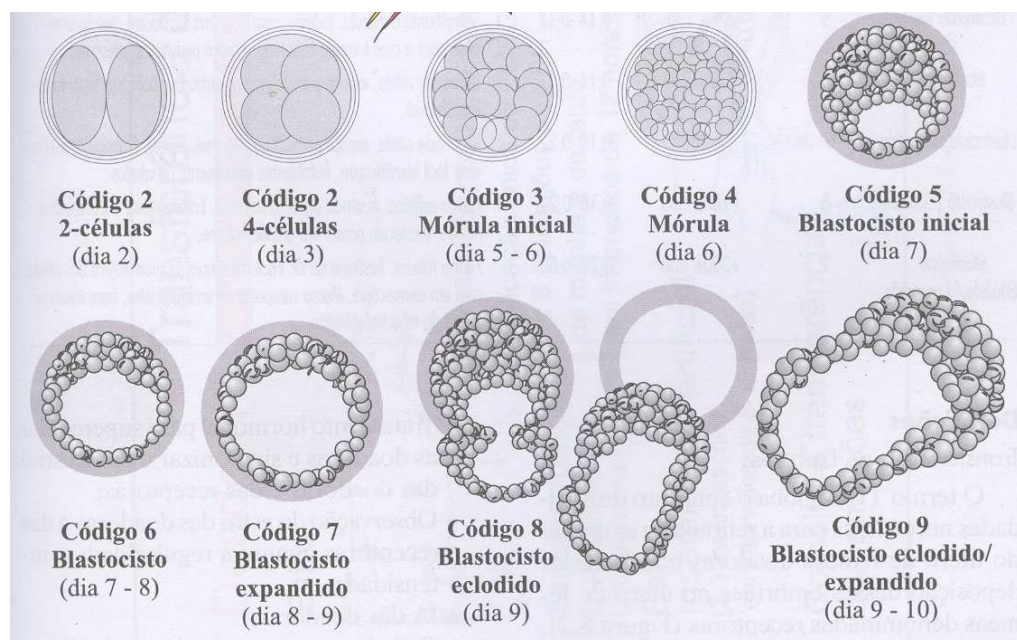


FIGURA 6– Representação esquemática dos estádios de desenvolvimento embrionário em bovinos, considerando-se os códigos recomendados pela IETS (1998) (Gonsalves *et al.*, 2002a).

Código da IETS	Avaliação	Principais características morfológicas
1	Excelente ou Bom	<ul style="list-style-type: none"> - estágio de desenvolvimento corresponde ao esperado; - massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade; - forma regular, a zona pelúcida (ZP) não deve apresentar superfície côncava ou plana, deve ser lisa, preferencialmente intacta, especialmente se o embrião for destinado à exportação; - células extrusadas da massa celular do embrião compreendem menos de 15% de material celular total.
2	Regular	<ul style="list-style-type: none"> - estágio de desenvolvimento corresponde ao esperado; - forma regular, ZP intacta ou não, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais; - células extrusadas da massa celular do embrião compreendem menos de 15% de material celular total; - pelo menos 50% das células compõem uma massa embrionária viável, intacta.
3	Pobre	<ul style="list-style-type: none"> - estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado; - irregularidades maiores na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais; - menos de 75% de células degeneradas; - pelo menos 50% das células compõem uma massa embrionária viável, intacta.
4	Morto ou degenerado	<ul style="list-style-type: none"> - estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado, embrião em degeneração; - massa embrionária de menos de 25% de todo material celular presente na ZP; - oócitos ou estruturas unicelulares degeneradas.

TABELA 1- Critérios para avaliação de embriões bovinos segundo os parâmetros de qualidade propostos pela IETS (1998) (Gonsalves *et al.*, 2002a).

Após a classificação dos embriões, estes são colocados em palhinhas de 0,25 ml (Figura 7). A colocação nas palhinhas deve ser feita de forma, a que o embrião esteja numa posição central e entre duas colunas de meio. As palhinhas devem ser identificadas quanto à dadora e ao estágio de desenvolvimento (Ribeiro Filho, 2007).

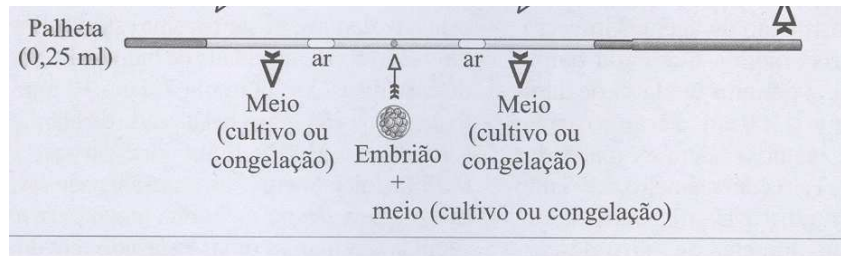


FIGURA 7– Colocação do embrião numa palhinha de 0,25 ml (Gonsalves *et al.*, 2002a).

2.11- TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Apenas os embriões entre os estádios de desenvolvimento de mórula e blastocisto expandido devem ser transferidos para as receptoras (Gonsalves *et al.*, 2002a).

A transferência pode ser realizada de forma cirúrgica, sendo o acesso pelo flanco, acarretando os riscos descritos, ou por via transcervical (a mais utilizada) (Gregory, 1987).

Antes da transferência deve-se realizar a selecção das receptoras. Esta é feita com base na avaliação do corpo lúteo. Hanekamp (1999) classificou o corpo lúteo das receptoras de embriões por palpação rectal em três graus de qualidade: 1- CL ausente ou não evidente, 2- CL presente e 3- CL bem perceptível. Esta avaliação é realizada para escolher qual o embrião (conforme o estágio de desenvolvimento e classificação) a colocar em cada receptora.

Depois da selecção, as receptoras devem ser sedadas e anestesiadas, seguindo o mesmo protocolo das dadoras. O método de transferência é semelhante ao utilizado na inseminação artificial, sendo o embrião colocado no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo cíclico (Zanega, 1987).

2.12- IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA E RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

A gestação é frequentemente dividida em três fases: a fase inicial que vai desde a fecundação até ao 13º dia de gestação; a fase embrionária, a partir do 14º dia até ao 45º, na qual as camadas germinativas se começam a formar; e por último a fase fetal que dura do 46º dia até ao final da gestação (Ball e Peters, 2002d).

A implantação embrionária, ou seja, do blastocisto no útero materno, é uma adaptação embrionária associada à viviparidade necessária para garantir a nutrição e a protecção do conceito durante a gestação. Nos mamíferos estão envolvidas diferentes estratégias no processo de implantação. Nos ruminantes domésticos o blastocisto passa da forma esférica para a tubular, alongando-se rapidamente e formando as membranas embrionárias antes de ocorrer a implantação (Spencer *et al.*, 2004).

Durante o período inicial de gestação, a comunicação materno-embrionária é mediada pelo trofoblasto. Este envia sinais para que proteínas específicas da gestação sejam libertadas no sangue materno, levando a que ocorram alterações morfológicas, bioquímicas e imunológicas no ambiente uterino, permitindo a implantação do embrião (Schlafke e Enders, 1975; Hafez e Hafez, 2004d).

O período de pré-implantação compreende interações materno-embrionárias espécie-específicas que estão ligadas ao reconhecimento materno e à manutenção da gestação. O conceito sintetiza e secreta citocinas (interferões, interleucinas 1, 2, 4, 6, 10 e outras), enzimas (proteínases), prostaglandinas (F e E), hormonas (estrogénio) e outros factores ainda desconhecidos. Durante este período, os interferões trofoblásticos exercem um papel muito importante na maioria das espécies (Schäfer-Somi, 2003).

Entende-se por reconhecimento materno da gestação a interacção endócrina, bioquímica e molecular entre o conceito e o tecido uterino, com a consequente manutenção do corpo lúteo, garantindo concentrações óptimas de progesterona na circulação sanguínea para manutenção da gestação (Hansen, 1991)

Os bovinos necessitam da permanência do corpo lúteo até aproximadamente o 200º dia de gestação, para que os elevados níveis de progesterona permitam sustentar a gestação através de mecanismos que inibem a luteólise (Hafez e Hafez, 2004d).

O “período crítico” no ciclo reprodutivo da vaca pode ser definido como o período em que há o bloqueio do processo luteolítico, no momento em que a gestação é estabelecida. Este processo é de extrema importância para a manutenção da gestação, e ocorre entre os 15º e 17º dias após o estro. O bloqueio da luteólise depende da capacidade do concepto em enviar sinais antiluteolíticos e do endométrio materno em responder a estes sinais, bloqueando assim a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esta comunicação materno-embrionária nem sempre é bem sucedida, resultando na ocorrência da luteólise e na consequente perda embrionária (Binelli *et al.*, 2001; Spencer, 2004).

Sinais para o reconhecimento da gestação são oriundos da acção dos trofoblastos, que actuam de forma parácrina interrompendo a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial, através da acção dos interferões. O interferão identificado como a molécula antiluteolítica nos bovinos, é denominada de interferão-rau (IFN- τ) (Barros *et al.*, 1994; Bazer *et al.*, 1994).

O IFN- τ é uma proteína constituída por 172 aminoácidos, que apresenta um peso molecular entre 22 a 24 KDa e é produzida pelas células trofoblásticas do embrião. Apenas existe em ruminantes e é característica do concepto bovino entre o 16º e 24º dias, sendo independente do meio uterino. Tem uma função anti-luteolítica, uma vez que inibe a expressão dos genes codificadores para os receptores endometriais da ocitocina e do estrogénio, impedindo consequentemente a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, a partir da ocitocina libertada pelo corpo lúteo (Gonsalves *et al.*, 2002c)

Embora a maior expressão do IFN- τ ocorra no 15º dia de gestação, momento que coincide com a fase de transição do embrião da forma esférica para a forma tubular, é no 17º dia de gestação que é o seu pico de produção, pois seria nesse dia do ciclo que ocorreria a luteólise se a fêmea não estivesse gestante (Figura 8) (Ball e Peters, 2002d).

A concentração do IFN- τ está directamente relacionada com os níveis de progesterona. Quanto maior a concentração de progesterona na fase inicial da gestação, maior será o desenvolvimento do embrião e, consequentemente, maiores os níveis de IFN- τ , levando a que haja uma diminuição das perdas gestacionais nesta fase (Gonsalves *et al.*, 2002c) .

Todavia, com o processo de implantação embrionária, os níveis do IFN- τ vão decrescendo à medida que determinadas partes do embrião começam a estabelecer contacto com a parede uterina, tornando-se o embrião dependente da fêmea para a sua sobrevivência. O embrião fixa-se ao endométrio pelas suas membranas, através das quais há transferência de nutrientes e metabólitos da fêmea para o embrião (Ball e Peters, 2002d).

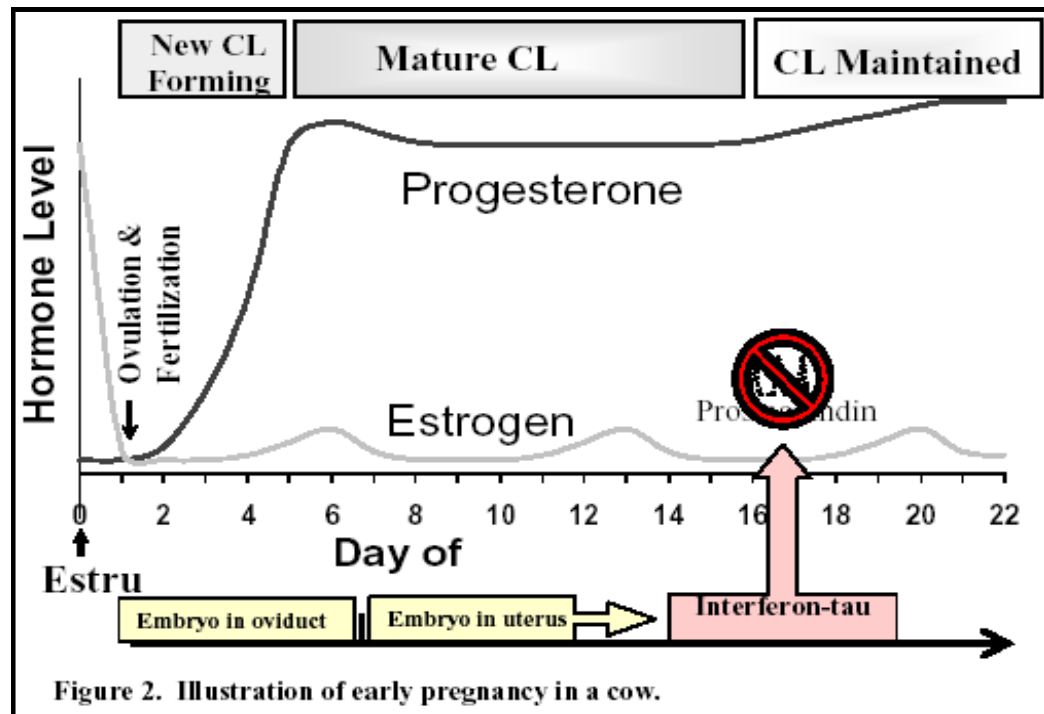


FIGURA 8-. Esquema representativo do início da gestação em vacas (Geary, 2005).

2.13- ALGUNS FACTORES QUE INFLUENCIAM A TAXA DE GESTAÇÃO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS

O período de gestação é definido como o intervalo que vai desde o acasalamento fértil até ao parto. Embora seja determinado geneticamente pode ser modificado por factores maternos (idade e raça), fetais (tamanho, placenta e sexo), genéticos (raça) e ambientais (estação do ano) (Hafez e Hafez, 2004e).

A perda da gestação é responsável pela maior parte das falhas gestacionais em animais domésticos. As perdas podem ser divididas em mortalidade embrionária e mortalidade fetal (Hafez e Hafez, 2004e).

A mortalidade embrionária pode ocorrer antes do reconhecimento materno (morte embrionária precoce) ou depois deste (morte embrionária tardia), podendo ser provocada por factores endócrinos, pelo estado nutricional da fêmea e pelo stress, entre outros factores (Molina, 2005). Estes podem afectar, separadamente, apenas a mãe ou o embrião, ou podem interferir na interacção materno-embrionária.

Os factores endócrinos resultam do desequilíbrio estrogénio-progesterona levando à morte pré-implantação, uma vez que o efeito luteolítico não é impedido ocorrendo regressão do CL, com consequente falha gestacional (Hafez e Hafez, 2004e).

O suprimento calórico e as deficiências a nível nutricional afectam as taxas de ovulação e fertilização, assim como provocam a morte embrionária. Os extremos alimentares são prejudiciais para a sobrevivência embrionária, assim como os extremos no suprimento de nutrientes específicos (Hafez e Hafez, 2004e).

O stress pode ser provocado pelo transporte, por alterações na alimentação e sobretudo por alterações térmicas, entre outras. Tanto as temperaturas muito baixas como as muito elevadas podem levar à morte embrionária. Porém, a morte embrionária é mais significativa depois da exposição a temperaturas elevadas, principalmente nas áreas tropicais. O stress térmico entre o 8º e 17º dias de gestação pode alterar o ambiente uterino, assim como o crescimento e a actividade secretora do concepto. O stress térmico pode antagonizar os efeitos inibidores do embrião sobre a secreção uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Hafez e Hafez, 2004e).

A morte fetal ocorre durante a fase fetal sendo provocada por causas não infecciosas como a acção de agentes químicos, drogas, plantas tóxicas, problemas hormonais, nutricionais, genéticos e imunológicos, ou por causas infecciosas como protozoários (Tricomonose e Neosporose), bactérias (Brucelose, Vibriose, Leptospirose e Listeriose), vírus (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e Diarreia Viral Bovina) e fungos (Micoses) (Hafez e Hafez, 2004e).

A taxa de sobrevivência embrionária, após a transferência de embriões pode ser influenciada por factores como anormalidades cromossómicas, efeito da dadora, idade e qualidade dos embriões transferidos, método e local de transferência, sincronia dadora-receptora, estado nutricional e níveis séricos de progesterona na receptora, bem como o stress calórico (Ribeiro Filho, 2007).

Porém, um dos principais factores associados à mortalidade embrionária é a concentração de progesterona no período inicial da gestação, uma vez que a progesterona tem um papel fundamental no processo de placentação e na manutenção do embrião durante a adesão placentária (Araújo, 2005).

É durante as duas primeiras fases da gestação que ocorrem mais perdas, pelo que se deve ter especial atenção ao manejo das dadoras até ao 7º dia de gestação, e ao das receptoras a partir do 7º dia até ao final da gestação. Isto para que o embrião possa sinalizar a sua presença à fêmea receptora e impedir a luteólise, que ocorreria se a fêmea não estivesse gestante (Ball e Peters, 2002d).

2.14- DIFERENÇAS ENTRE AS ESPÉCIES *BOS TAURUS* E *BOS INDICUS*

É muito importante o conhecimento das diferenças físicas e fisiológicas entre *Bos indicus* (Figura 9) e *Bos taurus* (Figura 10), uma vez que estas implicam diferentes técnicas de manejo e de emprego das tecnologias da reprodução, como a inseminação artificial, transferência de embriões e fecundação *in vitro*.

No Brasil, os genótipos de *Bos indicus* utilizados apresentam um peso mais elevado, assim como, maior comprimento e altura em relação aos genótipos de *Bos taurus*. As vacas adultas medem em média 165 cm de comprimento e 155 cm de altura, podendo atingir os 800 kg, enquanto que os machos, têm 177 cm de comprimento e 170cm de altura, ultrapassando facilmente os 1100 kg. As vacas *Bos taurus* podem medir até 150 cm de comprimento e 145 cm de altura, com um peso médio de 470 kg. Quanto aos machos medem aproximadamente 170cm de comprimento e 160 cm de altura, sendo o seu peso médio de 800 kg (ABCZ, 2007).

Os animais *Bos indicus* apresentam uma melhor capacidade de adaptação às condições dos trópicos, relativamente aos *Bos taurus*. Podem enfrentar longos períodos de seca e restrição alimentar que duram até 6 meses, alimentando-se de alimentos grosseiros. (ABCZ, 2007)

Apresentam uma resistência natural aos ectoparasitas devido às características dos seus pêlos, que dificultam ou impedem a sua penetração na superfície da pele. A pele é escura, fina e resistente e além de produzir uma secreção oleosa e repelente aos insectos, é muito rica em melanina, funcionando como protector contra os raios

solares, apresentando também propriedades que permitem reflectir, absorver, irradiar e filtrar as diferentes radiações solares presentes nos trópicos (ABCZ, 2007).

Os animais *Bos indicus* utilizados para a produção de carne apresentam uma grande capacidade de ganho de peso, não sendo propícios à formação de gordura excessiva, uma vez que o esqueleto e os músculos se desenvolvem rapidamente sem que haja acumulação de gordura intramuscular, como acontece nos animais *Bos taurus*. A sua carcaça permite um rendimento de desmancha de aproximadamente 70% pois têm a cabeça pequena, o aparelho digestivo proporcionalmente menor relativamente a *Bos taurus*. O quarto traseiro é proporcionalmente maior que o dianteiro, assegurando uma maior quantidade de peças nobres (Josahkian, 2005).

Fisiologicamente, o *Bos indicus* apresenta um metabolismo mais lento do que *Bos taurus*. Relativamente à fisiologia reprodutiva, as fêmeas *Bos indicus* apresentam um estro de duração mais curta, sendo a sua maior incidência nocturna. As fêmeas *Bos taurus* têm ciclos éstricos com predominância de duas a três ondas, enquanto as *Bos indicus* podem ter até quatro ondas por ciclo. Outra diferença reside no número de folículos recrutados por onda, sendo maior em *Bos indicus* (Baruselli *et al.*, 2007)

A puberdade em animais da espécie *Bos taurus* ocorre mais precocemente do que em *Bos indicus*, apresentando o folículo dominante menor tamanho nas últimas. O corpo lúteo também é menor em *Bos indicus* do que em *Bos taurus*, produzindo, consequentemente, menos progesterona (Baruselli *et al.*, 2007).

Outra característica que diferencia *Bos taurus* de *Bos indicus* é a obtenção de estádios embrionários mais avançados em *Bos indicus* quando comparados com os obtidos em *Bos taurus*. Esta característica pode ser explicada pelo facto da LH apresentar uma onda pré-ovulatória entre 20 a 22 horas antes da ovulação ou 3 a 6 horas depois do início do estro em fêmeas *Bos taurus* (Henricks *et al.*, 1970, citado por Fonseca *et al.*, 2001), enquanto que em fêmeas *Bos indicus* esta ocorre mais precocemente (Cavalieri *et al.*, 1997 citado por Fonseca *et al.*, 2001). Assim, em fêmeas *Bos indicus* a ovulação ocorre mais precocemente, o que pode reflectir fertilizações também mais precoces, o que dá aos embriões das últimas tempo adicional para se desenvolverem, permitindo-lhes atingirem estádios de desenvolvimento mais avançados no dia da recolha, quando comparados com os embriões obtidos de fêmeas *Bos taurus* (Fonseca *et al.*, 2001).

Por último, a duração da gestação é 10 dias mais longa em *Bos indicus* do que em *Bos taurus*, podendo o anestro pós-parto ser também superior nesta espécie (Tabela 2) (Baruselli *et al.*, 2007).



FIGURA 9- *Bos indicus*.



FIGURA 10- *Bos taurus*.

	<i>Bos indicus</i>	<i>Bos taurus</i>
Duração do estro (horas)	12,9 +/- 2,9	16,3 +/- 4,8
Intervalo início do estro-ovulação (horas)	2,7 +/- 3,3	26,1 +/- 6,3
N.º de ondas de crescimento folicular	2 a 4	2 a 3
Dia da divergência folicular	2,5 a 2,7 dias pós-ovulação	2,8 dias após a emergência
Diâmetro do folículo dominante na divergência (mm)	5,4/5,9/6,2	8,5
Diâmetro do maior folículo subordinado na divergência (mm)	5,3/5,9	7,2
Diâmetro que adquire a capacidade ovulatória (mm)	7,0 a 8,5	10,0
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)	11,6 a 12,1	13,9 a 16,5
Diâmetro do corpo lúteo (mm)	17 a 21	20 a 30

TABELA 2- Principais diferenças na fisiologia reprodutiva de fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* (Baruselli, 2007).

2.15- RAÇA NELORE (*BOS INDICUS*)

A raça Nelore tem um papel fundamental na pecuária brasileira, uma vez que corresponde aproximadamente a 85% de toda a produção de carne do país (ABCZ, 2007).

Depois da Índia, o Brasil é o possuidor do maior e melhor rebanho de genótipos de *Bos indicus*, cuja qualidade se eleva gradualmente como resultado dos trabalhos selectivos, que visam o melhoramento racial e funcional (ABCZ, 2007).

O rebanho bovino brasileiro tem por base os genótipos *Bos indicus* originários da Índia, sendo a raça Nelore correspondente à Ongole da Índia (ABCZ, 2007).

O primeiro registo da entrada da raça Nelore no Brasil foi em 1869, predominando até esta data as raças europeias (*Bos taurus*). Porém, apenas no século XX, a raça Nelore passou a ser a principal no Brasil, tendo sido a última importação oficial em 1962 (ABCZ, 2007).

Os animais da raça Nelore como todos os animais da espécie *Bos indicus*, têm uma excelente capacidade de adaptação às condições dos trópicos. A raça Nelore, é uma raça rústica, fértil, de longa vida reprodutiva e que apresenta resistências naturais às doenças mais comuns destas regiões (ABCZ, 2007).

A garupa das vacas apresenta uma inclinação natural que em conjunto com a angulosidade e a boa abertura pélvica, permite um parto sem complicações de bezerros saudáveis com cerca de 30kg, que procuram acompanhar a manada depois do nascimento (ABCZ, 2007).

Porém, é no aspecto da conversão alimentar, principal objectivo da pecuária de corte que esta raça se destaca, uma vez que apresenta as características da espécie *Bos indicus* com uma grande capacidade de ganho de peso sem acumulação de gordura intramuscular (ABCZ, 2007).

Tendo em vista a tendência actual do mercado, no sentido de dar preferência às carnes com baixa percentagem de gordura, o desenvolvimento pecuário das dos diferentes genótipos de *Bos indicus* é favorecido, abrindo novas perspectivas nos mercados internacionais (ABCZ, 2007).

Assim, por todas as características apresentadas, a raça Nelore é no Brasil, aquela em que são aplicadas o maior número de tecnologias da reprodução.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- OS ANIMAIS

Este estudo foi desenvolvido no âmbito de um projecto da UFBA sob a orientação do Prof. Dr. António de Lisboa Ribeiro Filho, no período de Setembro a Dezembro de 2007, em seis propriedades privadas com manejo sanitário e nutricional semelhante, localizadas no Estado da Bahia, Brasil.

Foram utilizadas fêmeas bovinas da raça Nelore registadas na ABCZ (Associação Brasileira de Criadores de Zebu) de superioridade genética comprovada como dadoras de embriões. Para receptoras, seleccionaram-se 571 fêmeas bovinas em idade reprodutiva, cruzadas de genótipos *Bos taurus* e cruzadas de genótipos *Bos indicus* com condição corporal (CC) entre 3 e 4 (escala de 1 a 5). Todas as fêmeas utilizadas foram avaliadas quanto ao seu estado clínico-ginecológico, para verificar se estavam aptas ao processo de superovulação (dadoras) e à manutenção de uma possível gestação (receptoras). As receptoras foram divididas em dois grupos, tendo como principal critério a divisão entre as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus*.

Todos os animais foram mantidos em regime de pastoreio dispondo de água *ad libitum* e de um suplemento mineral e vitamínico.

O controlo sanitário do rebanho foi realizado periodicamente, seguindo um esquema pré-estabelecido pelo técnico veterinário das propriedades.

3.1a- RECEPTORAS

Para receptoras são escolhidos animais que apresentem as melhores capacidades maternas e que mantenham a rusticidade, para que melhor se possam adaptar às condições existentes.

Assim, as vacas *Bos taurus* são escolhidas pela sua habilidade materna, menor tempo de gestação e menor anestro pós-parto, permitindo um menor intervalo entre partos e melhor aproveitamento como receptora.

As vacas *Bos indicus*, são seleccionadas por apresentarem melhores condições de adaptação ao meio.

3.2- TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DAS DADORAS

Neste protocolo de transferência de embriões foram adoptados como parâmetros o dia zero (D0) como início do protocolo de superovulação/sincronização das dadoras, o período considerado manhã foi correspondente entre as 6 e 7 horas da manhã e o considerado tarde das 18 às 19 horas.

O tratamento hormonal das dadoras foi realizado segundo Ribeiro Filho *et al.* (2004) (Figura 11), modificado pela utilização de um indutor da ovulação.

Sincronizou-se a onda folicular com um implante vaginal contendo 1,9 g de progesterona (CIDR, Pfizer, Brasil) no dia 0 (D0) e com a aplicação de 3 mg de benzoato de estradiol (Estrogin, Farmavet, Brasil) por via intramuscular (IM) no dia 1 (D1).

O tratamento superovulatório iniciou-se no dia 5 (D5) com uma quantidade total de 250 UI de gonadotrofina hipofisária suína (Pluset, Calier, Brasil), divididas em oito doses decrescentes (50 UI bid; 37,5 UI bid; 25 UI bid e 12,50 UI bid). Com a quinta aplicação de FSH, foram administrados 150 mg de D-Cloprostenol (Prostaglandina Tortuga, Tortuga, Brasil) IM e com a sexta dose de FSH, as vacas receberam mais 75 mg de D-Cloprostenol (Prostaglandina Tortuga, Tortuga, Brasil) IM. No dia 8 (D8) pela manhã, foi retirado o implante de progesterona. No dia 9 (D9) pela manhã foram administrados 2 ml de um análogo de GnRH IM, a Lecirelina (Gestran Plus, Tecnopec, Brasil), para indução da ovulação.

Todas as dadoras utilizadas neste trabalho foram submetidas ao mesmo protocolo de superovulação.

As inseminações das dadoras foram realizadas em tempo fixo (IATF), nos dias 9 de tarde e 10 pela manhã. Para tal, foram utilizadas doses comerciais de sémen criopreservado, provenientes de animais com fertilidade comprovada.

As fêmeas foram inseminadas por via transcervical, por um profissional treinado e habilitado para o procedimento.

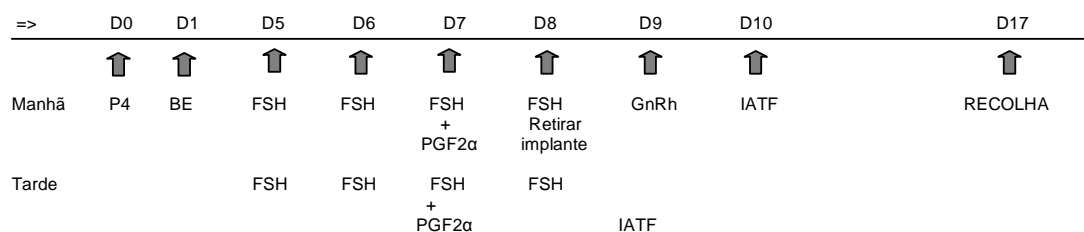


FIGURA 11– Protocolo de sincronização e superovulação em dadoras.

O manejo e armazenamento de sémen destinado às inseminações seguiram a metodologia descrita por Senger (1986). Para a descongelação das amostras de sémen utilizou-se um recipiente térmico próprio. As palhinhas de 0,25 ml foram descongeladas a 37 °C, não tendo sido o tempo de descongelação menor que 30 segundos ou maior que um minuto (Senger, 1986).

O sémen utilizado foi avaliado segundo o Manual Para Exame Andrológico e Avaliação de Sémen Animal - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Henry e Neves, 1998), tendo sido utilizadas apenas as que alcançaram os requisitos básicos nas características físicas e morfológicas.

3.3- RECOLHA DOS EMBRIÕES

Antes de cada recolha, efectuou-se a limpeza e a assepsia da região perineal das dadoras com água e álcool a 70%, respectivamente. As dadoras foram tranquilizadas, utilizando 0,50 ml de acepromazina a 1% (Acepran, Vetnil, Brasil), e posteriormente anestesiadas através de anestesia epidural, com 4 a 7 ml de lidocaína a 2% (Anestésico L, Pearson, Brasil), de modo a diminuir o peristaltismo e desconforto dos animais durante o procedimento.

Os embriões foram colhidos não cirurgicamente (pelo método transcervical) no sétimo dia após a primeira IA, em meio de lavagem uterina com solução de PBS (DMPBS, Nutricell Nutrientes Celulares LTDA, Brasil).

O conteúdo uterino foi filtrado em filtros para embriões, colocado em placas de Petri descartáveis e observado ao estereomicroscópio, com o objectivo de identificar e seleccionar os embriões.

Depois de identificados, os embriões foram colocados numa solução de manutenção (Holding, Bioniche Animal Health, EUA), para serem avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade. Nesta avaliação foram considerados, o número de células, a compactação dos blastómeros, a forma, cor e tamanho das células, a presença ou não de extrusão celular, a diferenciação visual entre trofoblasto e a massa celular interna, além da presença do blastocélio.

A partir da recolha dos embriões avaliou-se o número de estruturas colhidas, o número de estruturas fertilizadas e o número de embriões viáveis em cada grupo.

As estruturas foram classificadas em relação à qualidade e estágio de desenvolvimento segundo as orientações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) e apenas aquelas com grau de qualidade 1, 2 e 3 foram consideradas viáveis e posteriormente transferidas. Os embriões foram colocados em palhinhas de 0,25 ml devidamente identificadas.

3.4- PREPARAÇÃO DAS RECEPTORAS E TRANSFERÊNCIA

As receptoras foram sincronizadas de modo a realizar-se transferência de embriões em tempo fixo (TETF) (Figura 12).

No dia considerado zero (D0) as receptoras receberam um implante vaginal contendo 1 g de progesterona (DIB, Syntex S.A., Argentina) tendo sido também aplicado 2 mg de benzoato de estradiol IM (Estrogin, Farmavet Produtos Veterinários Ltda. São Paulo, Brasil). No dia cinco (D5) foi aplicado 150 mg de D-Cloprostenol (Prostaglandina Tortuga, Tortuga, Brasil) juntamente com 400 UI de eCG IM (Novormon 5000®, Syntex S.A., Argentina). Os implantes intravaginais foram removidos no dia oito (D8) e no dia nove (D9) pela manhã administrou-se 1mg de benzoato de estradiol. O estro não foi utilizado como factor pré-requisito para a transferência de embriões.

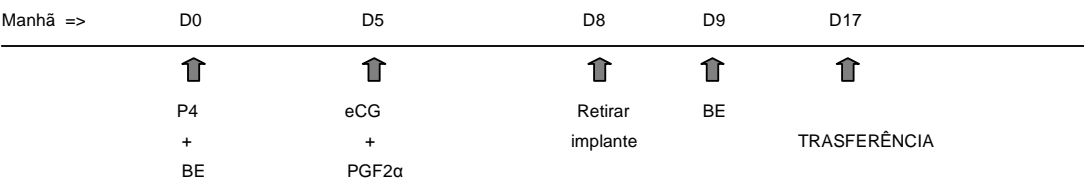


FIGURA 12- Protocolo de sincronização em receptoras.

Antes da transferência, as fêmeas destinadas à recepção dos embriões foram reavaliadas ginecológicamente, para determinar a presença do corpo lúteo.

Realizou-se a técnica de transferência não cirúrgica (realizada por três operadores diferentes) com tranquilização prévia e aplicação de anestesia epidural. Depois de efectuada a higienização do aparelho reprodutor externo, colocou-se apenas um embrião no corpo *ipsilateral* (porção apical) ao ovário que continha o corpo lúteo, através de um *pistollet* revestido por uma camisa sanitária contendo a palhinha de 0,25 ml.

3.5- DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação das vacas receptoras foi realizado por ecografia transrectal 45 dias depois das respectivas transferências. Utilizou-se um ecógrafo modo B (ALOKA, SSD-500, Wallingford, CT.), com um transdutor rígido de 5.0 MHz, do tipo transrectal. O desempenho reprodutivo foi avaliado através da taxa de gestação, ou seja, da proporção de vacas gestantes em relação ao número de vacas submetidas a transferência.

3.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o Proc GLM do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) e um modelo incluindo os efeitos fixos da exploração, genótipo, fase, qualidade do embrião, falicidade do procedimento e suas interações. As interações não significativas ($p > 0.05$) foram retiradas do modelo final de análise.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito	n	Taxa de gestação n.º de positivos/n.º total (%)		
		<i>Bos taurus</i>	<i>Bos indicus</i>	Total
Exploração	571			
1	66	18/48 (37.5)	10/18 (55.5)	28 (42.4)
2	55	7/18 (38.9)	17/37 (45.9)	24 (43.6)
3	99	39/70 (55.7)	18/29 (62.0)	58 (58.6)
4	72	18/50 (36.0)	6/22 (27.3)	24 (33.3)
5	89	48/83 (57.8)	0/6 (0)	48 (53.9)
6	190	96/179 (53.63)	11/24 (45.9)	107 (56.3)
Estádio de desenvolvimento do embrião	571			
4 (Mórula)	312	110/249 (44.1)	16/63 (25.4)	312/571 (54.5)
5 (Jovem Blastocisto)	164	77/137 (56.2)	14/27 (51.9)	91/164 (55.5)
6 (Blastocisto)	51	19/30 (63.3)	16/21 (76.2)	35/51 (68.6)
7 (Blastocisto Expandido)	21	4/14 (28.5)	6/7 (85.7)	10/21 (47.6)
Grau de dificuldade de passagem do cervix	571			
1 (Fácil)	170	75/122 (61.5)	26/48 (54.1)	101/170 (59.4)
2 (Média)	254	108/205 (52.7)	21/49 (42.9)	129/254 (50.8)
3 (Difícil)	145	40/106 (37.7)	8/39 (20.5)	69/145 (47.6)
Qualidade do embrião	571			
1 (Excelente ou Boa)	185	81/135 (60.0)	22/50 (44.0)	103/185 (55.7)
2 (Regular)	290	108/224 (48.2)	26/66 (39.4)	136/290 (46.9)
3 (Pobre)	105	34/76 (44.7)	7/29 (24.1)	41/105 (39.0)

TABELA 3- Tabela descritiva da influência do genótipo na taxa de gestação.

Os valores obtidos para a transferência de embriões sobre a taxa de gestação estão de acordo com o padrão de normalidade considerado para a espécie bovina (Ribeiro Filho, 2007).

Através da tabela descritiva, observa-se uma taxa de gestação maior para o genótipo *Bos taurus* quando comparado com o genótipo *Bos indicus*, excepto nas explorações 1, 2 e 3 e quando são transferidos embriões nos estádios de blastocisto e blastocisto expandido.

Efeito	n	Média Ajustada	Erro padrão	F	P
Exploração	571			2.19	0.054
1	66	47.8	6.86		
2	55	43.8	7.54		
3	99	61.5	5.79		
4	72	40.3	6.92		
5	89	36.4	10.59		
6	190	55.2	5.88		
Genótipo da receptora	571			2.18	0.140
X <i>Bos taurus</i>	435	51.6	4.17		
X <i>Bos indicus</i>	136	43.4	5.52		
Estádio de desenvolvimento do embrião	571			8.39	<0.0001
4 (Mórula)	319	32.5 b	3.38		
5 (Jovem Blastocisto)	174	50.3 a	4.32		
6 (Blastocisto)	58	60.6 a	6.71		
7 (Blastocisto Expandido)	20	46.6 ab	11.4		
Qualidade do embrião	571			1.67	0.189
1 (Excelente ou Bom)	185	52.8	4.62		
2 (Médio)	281	47.4	4.51		
3 (Pobre)	105	42.2	5.94		
Grau de dificuldade de passagem do cervix	571			12.13	<0.0001
1 (Fácil)	170	59.9 a	4.95		
2 (Média)	256	49.5 b	4.63		
3 (Difícil)	145	33.1 c	5.32		
Exploração*Genótipo	571			2.35	0.04
1 * <i>B. taurus</i>	48	39.9	6.93		
1 * <i>B. indicus</i>	18	55.6	11.60		
2 * <i>B. taurus</i>	18	40.2	11.70		
2 * <i>B. indicus</i>	37	47.3	8.32		
3 * <i>B. taurus</i>	70	58.8	6.58		
3 * <i>B. indicus</i>	29	64.2	8.94		
4 * <i>B. taurus</i>	50	43.4	7.54		
4 * <i>B. indicus</i>	22	37.2	10.60		
5 * <i>B. taurus</i>	83	63.5 a	6.21		
5 * <i>B. indicus</i>	6	9.3 b	19.62		
6 * <i>B. taurus</i>	166	64.0 a	5.10		
6 * <i>B. indicus</i>	24	46.5 b	9.94		

Índices (a,b,c) diferentes indicam valores significativamente diferentes (p<0.05)

Para a interação genótipo*fase as diferenças entre valores são apresentadas dentro de cada exploração.

TABELA 4- Médias ajustadas, erro padrão e valores de F e p, para os efeitos do genótipo da receptora, fase de desenvolvimento embrionário, qualidade do embrião, dificuldade de passagem do cervix, e interação genótipo*fase na taxa de gestação (coeficiente de determinação do modelo = 0.142, p<0.0001)

Não houve diferença estatística (p>0,05) entre os dois genótipos.

Seria de esperar que o genótipo da receptora influenciasse a taxa de gestação, uma vez que existem diferenças na fisiologia reprodutiva e na capacidade de adaptação ao meio entre os dois genótipos (Baruselli *et al.*, 2007).

Porém, a bibliografia apresenta-se contraditória. Uns autores (Josahkian, 2005) afirmam que o facto de as vacas *Bos indicus* apresentarem características de rusticidade e, conseqüentemente, de melhor adaptação ao meio é favorável a uma maior taxa de gestação. Enquanto que outros autores (Macedo *et al.*, 2007) defendem que a termotolerância observada no genótipo *Bos indicus* não protege o embrião dos efeitos deletérios do calor. Porém para Barusselli *et al.* (2007) as vacas *Bos taurus*, pelo maior diâmetro do corpo lúteo e maior produção de progesterona deveriam apresentar uma taxa de gestação superior à de *Bos indicus*.

Vacas expostas ao stress térmico provocado pelo calor têm uma alta incidência de mortalidade embrionária precoce (Putney *et al.*, 1989 citado por Macedo *et al.*, 2007).

As temperaturas ambientais elevadas durante os primeiros meses de gestação podem produzir efeitos deletérios no embrião. O seu mecanismo pode ser explicado pelo efeito directo da alta temperatura corporal que, conseqüentemente, aumentará a temperatura uterina actuando sobre o embrião e, pelo desvio de sangue do útero para a circulação periférica, como tentativa de manter a temperatura corporal que resulta na redução do aporte de nutrientes ao embrião (Molina, 2005).

O stress causado pelo calor, pode provocar efeitos negativos na eficiência reprodutiva, actuando no eixo hipotalâmico-hipofisário (GnRH) ou ao nível dos ovários (progesterona) (Molina, 2000).

Assim como a deficiência específica de algum nutriente, também pode causar um efeito negativo sobre o embrião (Ferreira, 2000).

Como são necessárias concentrações séricas adequadas de progesterona para a manutenção da gestação, o facto de vacas *Bos indicus* apresentarem um CL menor (e assim um conteúdo de progesterona por grama de tecido luteal menor) pode ser causa de mortalidade embrionária pela deficiência de progesterona provocada por uma insuficiência luteal primária (Imakawa *et al.*, 2004).

A secreção de progesterona é mantida durante o início da gestação, principalmente pela acção de factores anti-luteolíticos que protegem o CL do processo normal de luteólise (Hafez e Hafez, 2004e).

Em vacas com baixa concentração de progesterona esta inibição é menos efectiva e o mecanismo luteínico desenvolve-se antecipadamente proporcionando menor tempo para o embrião produzir suficiente IFN- τ (Lamming e Mann, 1993).

O estágio de desenvolvimento do embrião influencia a taxa de gestação, quando os embriões estão mais desenvolvidos a taxa de gestação também aumenta (Zanega, 1987), diminuindo apenas no estágio de blastocisto expandido, provavelmente, devido ao número reduzido da amostra.

Este factor está relacionado com o facto de que quanto mais desenvolvido o embrião estiver (até ao estágio de blastocisto expandido, a partir do qual não é possível transferir o embrião), maior será a secreção de factores fundamentais para o reconhecimento materno da gestação, pelo que a viabilidade das células trofoblásticas e a sua capacidade de secretar IFN- τ , não deverá ser comprometida (Araújo *et al.*, 2005).

Uma vez que os resultados não foram estatisticamente significativos, a qualidade do embrião não influenciou a taxa de gestação neste caso. Porém, pode-se observar que existe uma tendência para um decréscimo na taxa de gestação quando a qualidade é pior.

O grau de dificuldade de passagem pelo cérvix também influenciou a taxa de gestação, uma vez que a taxa de gestação é maior (59.9%) quando a passagem se processa facilmente e menor (33,1%) quando o grau de dificuldade é maior.

A manipulação do cérvix que ocorre durante a transferência pode aumentar a produção de PGF $_2\alpha$ endometrial. A manipulação do tracto reprodutivo representa um trauma para o endométrio uterino que pode desencadear um processo inflamatório. Durante este processo alguns mediadores químicos como as citocinas e as prostaglandinas são libertadas no local (Nothnick e Pate, 1990). Estas citocinas podem induzir a libertação de PGF $_2\alpha$ pelas células luteais e endometriais (Skarzynski *et al.*, 2000).

A $\text{PGF}_2\alpha$ atinge o CL e ao interagir com seus receptores bloqueia a síntese de progesterona causando a luteólise funcional (Carambula *et al.*, 2002).

Tanto a elevação tardia das concentrações de progesterona após a ovulação, como as baixas concentrações desta hormona na fase lútea estão associadas com o desenvolvimento embrionário pobre e com a produção de $\text{INF-}\tau$ insuficiente para prevenir a regressão do CL (Hafez e Hafez, 2004).

A exploração não afectou significativamente a taxa de gestação, embora os resultados entre os genótipos em cada exploração possam expressar as diferenças de adaptação dos genótipos a algumas características existentes nas explorações.

Apenas houve diferença estatística entre os genótipos nas duas últimas explorações, na qual *Bos taurus* apresenta uma taxa de gestação superior à de *Bos indicus*. As diferenças entre os genótipos não são da mesma ordem em todas as explorações, nestas duas explorações provavelmente, esta diferença pode ser devida à elevada diferença numérica entre os dois genótipos, ou às condições serem mais propícias a *Bos taurus* do que a *Bos indicus*. Não foi possível avaliar estas condições, uma vez que não são conhecidos os pormenores das explorações.

Porém, neste estudo não foram considerados os efeitos de cada operador nas transferências, sendo este factor de extrema importância, uma vez que o processo de Transferência de Embriões é influenciado e dependente da destreza e experiência do operador.

5- CONCLUSÃO

A mortalidade embrionária produz um impacto significativo na fertilidade dos rebanhos.

Esta pode ser provocada por vários factores, sendo as causas não infecciosas as mais comuns em situações endémicas, que devido ao seu carácter multifactorial, torna difícil estabelecer um diagnóstico correcto.

Entretanto, é importante saber quais as diferenças entre os genótipos de maneira a que se possam desenvolver protocolos antes ou depois da gestação que impeçam a morte embrionária, e consequentemente as perdas económicas envolvidas.

Porém, depois de realizado o trabalho é possível concluir que animais cruzados de *Bos taurus* podem ser utilizados em programas de Transferência de Embriões, no Brasil, com resultados equivalentes às receptoras de embriões *Bos indicus*, quando o manejo é adequado.

Também é importante o conhecimento das particularidades da fisiologia reprodutiva de *Bos taurus* e de *Bos indicus* para implementar técnicas que procurem a multiplicação de animais geneticamente superiores e a melhoria da eficiência reprodutiva.

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Estágio Final Curricular foi bastante importante para a minha formação profissional, uma vez que me permitiu conhecer outras formas de abordagem das técnicas aplicadas à reprodução animal.

Deu-me oportunidade de ver esta área de uma forma comercial, que em conjunto com os trabalhos teóricos e práticos realizados, poder-me-á ajudar a saber quais são as técnicas mais aplicáveis às necessidades e condições dos produtores pecuários em Portugal.

7- BIBLIOGRAFIA

7.1- BIBLIOGRAFIA CITADA

ABCZ Disponível em: <http://abcz.org.br/site/tecnica/racas/nelore.php>. Acesso em: 18 de Setembro de 2007.

Ahmad N; Schrick FN, Butcher RL, Inskeep EK (1995). Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biology Reproduction*, v.52: 1129–1135.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE PORTUGAL, 2006.

Araújo MCC, Vale Filho VR, Ferreira AM., Sá WF, Barreto Filho JB, Camargo LSA, Serapião RV, Silva MVGB. (2005). Secreção de interferão-tau em bovinos produzidos *in vitro* frescos e congelados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57 (6): 751-756.

Ball PJH, Peters AR. (2006). Ciclo Ovariano. In: *Reprodução em Bovinos*, 3.^a ed., Editora Roca (São Paulo) 38-52 (a).

Ball PJH, Peters AR. (2006). Controle Artificial do Ciclo Estral. In: *Reprodução em Bovinos*, 3.^a ed., Editora Roca (São Paulo) 104-117 (b).

Ball PJH, Peters AR. (2006). Biotecnologias Reprodutivas. In: *Reprodução em Bovinos*, 3.^a ed., Editora Roca (São Paulo) 183-205 (c).

Ball PJH, Peters AR. (2006). Fertilização, Concepção e Gestação. In: *Reprodução em Bovinos*, 3.^a ed., Editora Roca (São Paulo) 53-62 (d).

Barros CM, Nogueira MFG (2001). Embryo transfer in Bos indicus cattle. *Theriogenology*, 56:1483-1496.

Barusselli PS, Gimenes LU, Sales JNS (2007). Fisiologia reproductiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 31.(2): 205-211.

Baruselli PS; Marques MO, Carvalho NAT, Berber RCA, Carvalho Filho AF, Costa Neto WP (2003). Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com protocolo “Ovsynch” para inovulação em tempo fixo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 40:96-106.

Binelli M (2000). Estratégias anti-luteolíticas para melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: *Simpósio Controle Farmacológico do Ciclo Estral de Ruminantes*, São Paulo, SP, p.99-114.

Bó GA., Moreno D, Cutaia L, Barusselli PS, Reis EL, (2004). Manipulação hormonal do ciclo estral em dadoras e receptoras de embrião bovino, *Acta Scientae Veterinariae*, 32 (Supl):1-22.

Bó GA; Baruselli PS; Martinez MF (2003). Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 78:307-326.

Bó GA; Baruselli PS; Moreno D; Cutaia L; Caccia M; Tributo R; Tributo H; Mapletoft RJ (2002). The control of follicular wave development for self- appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57 (1):53-72.

Carambula SF, Maitikainem T; Lynch, MP; Flavel RA; Dias Goncalves PB; Tylli JL; Rueda BR (2002). Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of ovarian corpus luteum. *Endocrinology*, 143.(4): 1495-1501.

Chagas e Silva JN. (2004) Transferência embrionária, sexagem de sêmen e embriões, In: Jornadas Ibéricas de Bovinicultura Leiteira, Disponível em: <http://docentes.esa.ipcb.pt/bovinosdeleite/aajnestor.pdf>. Acesso em 23 de Janeiro de 2008.

Chagas e Silva JN (2001) Legislação e normas portuguesas referentes à aplicação de biotecnologias reprodutivas em bovinos, In: III Congresso Ibérico de Reprodução Animal, Porto.

Corteel JM; Leboeuf B; Baril G (1988). Artificis breeding of adult goats and kids induce with hormones to ovolute outside the breeding seanso. Small Ruminants Research, 1: 19-35.

Demczuk E; Kozicki LF; Pontelli ES; Salles JO (1998). Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul. Brasil. J. Vet. Res. Anim. Sci., 35 (4): 174-177.

EMBRAPA GADO DE CORTE (1991), Controle do ciclo estral e ovulação. Disponível em: <http://www.cnpqc.Embrapa.Gado.de.Corte.1991.br/publicacoes/doc/doc48/05controle.html>. Acesso em: 16 de Setembro de 2007.

Ferreira AM, Viana JHM, Sá WF, Camargo LSA, Verneque RS (2000). Restrição alimentar e atividade ovariana luteal cíclica pós-parto em vacas girolanda, Pesquisa Agropecuária Brasileira, 35 (12): 2521-2528.

Fonsenca JF, Silva Filho JM, Pinto Neto A, Palhares MS (2001). Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 53 (6): 671-676.

Fortune JE (1993). Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? Animal Reproduction Science, 33 : 111-125.

Galli C; Duchi R; Crotti G; Turini P; Ponderato N; Colleoni S; Laugutina I; Lazzari G (2003). Bovine embryo technologies. Theriogenology, 59: 599-616.

Geary T (2005). Management strategies to reduce embryonic loss. Range Beef Cow Symposium XIX , Rapid City, South Dakota. Disponível em: <http://beef.unl.edu/beefreports/symp-2005-09-XIX.shtml> Acesso em 18 de Dezembro 2007.

Ginther OJ, Beg MA, Donadeau FX, Bergfelt DR (2003). Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. Animal Reproduction Science, 78: 239-257.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two or three follicular waves. Journal of Reproduction and Fertility, 87: 223-230.

Gioso MM, Costa EP, Fernandes CAC, Torres CAA, Carvalho GR (2005). Perfil de progesterona e intervalo do estro de receptoras bovinas sincronizadas com doses reduzidas de cloprostenol. Revista Brasileira de Zootecnia, 34 (4): 1181-1187.

Godkin JD, Smith SE, Johnson RD (1997). The role of trophoblast interferons in the maintenance of early pregnancy in ruminants, Am. J. Reprod. Immunol., 37: 137-143.

Gonsalves PBD, Figueiredo JF, Freitas VJF (2002). Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. In: *Técnicas Aplicadas À Reprodução Animal*, Editora Livraria Varela (São Paulo), 127-178 (a).

Gonsalves PBD, Figueiredo JF, Freitas VJF (2002). Controle do Estro e da Ovulação em Bovinos e Ovinos. In: *Técnicas Aplicadas À Reprodução Animal*, Editora Livraria Varela (São Paulo), 25-56 (b).

Gonsalves PBD, Figueiredo JF, Freitas VJF (2002). Diagnóstico de Gestação em Bovinos. In: *Técnicas Aplicadas À Reprodução Animal*, Editora Livraria Varela (São Paulo), 1-14 (c).

Gregory RM (1987). Fisiologia e Endocrinologia do trato reprodutivo feminino. In: *Curso Teórico-Prático de Transferência de Embriões* (Brasília), 30-45.

Hafez ESE; Hafez, B (2004). Bovinos e Bubalinos. In: *Reprodução animal*. 7ª.ed, Editora Manole. (São Paulo), 159-172 (a).

Hafez ESE; Hafez, B (2004). Hormônios, Fatores de crescimento e Reprodução. In: *Reprodução animal*. 7ª.ed, Editora Manole. (São Paulo), 33-55 (b).

Hafez ESE; Hafez, B (2004). Indução da Ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: *Reprodução animal*. 7ª.ed, Editora Manole. (São Paulo), 409-434 (c).

Hafez ESE; Hafez, B (2004). Implantação. In: *Reprodução animal*. 7ª.ed, Editora Manole. (São Paulo), 127-140 (d).

Hafez ESE; Hafez, B (2004). Gestação, Fisiologia Pré-Natal e Parto. In: *Reprodução animal*. 7ª.ed, Editora Manole. (São Paulo), 141-156 (e).

Hanekamp WJA (1999). Transfer of beef embryos in dairy cows: Influence of recipient and embryo quality on pregnancy rate and calving performance. *Reproduction in Domestic Animal*, .34: 459-463.

Hansen PJ (1991). Rescue of the corpus luteum from luteolysis by bovine trophoblast protein-1: ans example of maternal recognition of pregnancy. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 3 (supl. 1): 42-65.

Henry M; Neves JP(1998). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2 ed, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Belo Horizonte).

IBGE. 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 23 de Janeiro de 2008, 14:11

IETS. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (1998). 3 ed. Illinois Stringfellow, D.A&Seidel, S.M.

Imakawa K, Chang K-T, Christenson RK (2004). Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation, *Journal of Reproduction and Development*, 50 (2).

Josahkian LA (2005). As Raças Zebuínas no Brasil. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16.

Lamming GE, Mann GE (1995). A dual role for progesterone in the control of cyclicity in domestic ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 49: 561-566.

Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW (2006). Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*, 65: 201-209.

Lucy MC, McDougall S, Nation DP (2004). The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Animal Reproduction Science*, 82-83: 495-512.

Macedo GG, Katayama KA, Rueda PM, Zuccari CESN, Costa e Silva EV (2007). Estress por calor e performance reprodutiva de fêmeas Nelore doadoras de embriões. In: *Anais Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (Curitiba, Minas Gerais)*.

Molina, L (2005). Mortalidade embrionária em bovinos: Interrelações embrião-patógenos (Parte II). Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicação.doc?cdnoticia=1118>. Acesso em 22 de Outubro de 2007.

Nagano AY, Weiss RR, Buchele JM, Muradas PR, Granemann LC (2004). A somatropina bovina recombinante (rbST) na superovulação de fêmeas bovinas. *Archives of Veterinary Science*, 9 (2): 101-106.

Nothnick WB, Pate JL (1990). Interleukin-1 beta is a potent stimulator of prostaglandin synthesis in bovine luteal cells. *Biology Reproduction*, 43: 898-903.

Peixoto MGCD, Bergmann JAG, Alvim MTT, Penna VM (2004). Factores que influenciam a prenhez de embriões zebuínos em receptoras mestiças. In: *V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal (São Paulo)*.

Pineda MH (1999) Female Reproductive System. In: McDONALD, L.E. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 4.ed., Editora Lea & Feiberg, (Philadelphia), 303-354.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $_{2\alpha}$ and GnRH, *Theriogenology*, 44: 915-923.

Ribeiro Filho AL (2007). Apointamentos de apoio às aulas da disciplina de Inseminação Artificial em Bovinos e Andrologia- UFBA, Salvador, Bahia, Brasil.

Ribeiro Filho AL, Bittencourt RF, Portela APM, Freitas DS, Almeida AK, Silva AAB, Santana RCM, Chalhoub M (2004). Efeito do protocolo de sincronização do ciclo estral sobre a resposta superovulatória em um programa de Transferência de Embriões Zebuínos. In: *Acta Scientie Veterinariae*. Vol 32(suplemento), p. 207, Porto Alegre - UFRS.

Rodrigues JL (2001). Transferência de Embriões em Bovinos: histórico e perspectivas actuais. *Revista Brasileira de Reprodução*, Belo Horizonte, 25: 102-107.

Savio JD, Boland MP, Hynes N, Mattiacci MR, Roche JF (1990). Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7. *Theriogenology*, 33: 677.

Schäfer-Somi S (2003). Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. *Animal Reproduction Science*. 75: 73-94.

Schlafke S, Enders A (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biology of Reproduction*, 12: 41-65.

Senger PL (1986). Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen.in: *Current therapy in teriogenology*. 2.ed.,Saunders Company (Philadelphia), 167-174.

Skarzynsk, DJ, Miyamoto Y, Okuda K (2000). Production of prostaglandin F(2alpha) by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor alpha: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Biology Reproduction*, 62: 116–1120.

Spencer TE, Bazer FW (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2: 49-63.

Thibier M (2004). Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. Data Retrieval Committee Annual Report. Disponível em: www.iets.org/pdf/dataretrieval/december2004.pdf. Acesso em 17 de Outubro de 2007, 14:15.

USDA. Disponível em: http://findarticles.com/p/articles/mi_m0EEy/is_07/ai. Acesso em: 25 de Outubro de 2007.

Vasconcelos LV (2006). Efeito do Pré-tratamento com Somatotropina Recombinante Bovina sobre a Resposta Superovulatória e Qualidade de Embriões em Bovinos, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Dissertação apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Mato Grosso.

Webb R, Gosden RG, Telfer EE, Moor RM (1999). Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Animal Science*, 68: 257-284.

Zanega CA (1987) Sincronização de cios, superovulação de vacas e coleta não cirúrgica de embriões bovinos. In: *Curso Teórico-Prático de Transferência de Embriões* (Brasília), 56-70.

7.2- OUTRAS FONTES BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS

Bó GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ (1995). Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, 39: 93-204.

Chagas Silva J, Diniz P, Lopes da Costa L (2007). Luteotrophic effect, growth and survival of whole versus half embryos and, their relationship with plasma progesterone concentrations of recipient dairy heifers. *Animal Reproduction Science*, p.1-10.

Chagas Silva J; Lopes da Costa L, Robalo Silva J. (2002). Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, 58: 51-59.

Freitas, D.S. (2007) Uso de um inibidor da síntese de prostaglandinas sobre a taxa de prenhez em receptoras bovinas. Salvador, Bahia, Brasil,. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

Kyoji Y, Tosihiko N, Nakada K, Matsuda G (2002). Influence of GnRH analogue (fertirelin acetate) doses of synchronization of ovulation and fixed time artificial insemination in lactating dairy cows, *Animal Reproduction Science*, 74: 27-34.

Mcdougall S, Loeffler SH (2004). Resynchrony of postpartum dairy cow previously treated for anestrus. *Theriogenology*, 61: 239–53.

Santana RCM (2007). Avaliação de diferentes protocolos de sincronização do estro em receptoras de embriões bovinos. Salvador, Bahia, Brasil. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

Santos IW, Weiss RR, Kozicki LE (2000). Sincronização de estro em vacas de corte, *Archives of Veterinary Science*, 5: 1-4.